

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Michaela Malečková

VÝVOJ MINIATURIZOVANÉ EXTRAČNÍ METODY PRO SCREENING
NETĚKAVÝCH NITROSOSLOUČENIN VE SLADU POMOCÍ GC-NCD

Development of miniaturized extraction method used for GC-NCD
screening of non-volatile nitroso compounds in malt

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Odborná konzultantka: RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. května 2018.

Abstrakt

V této práci byla vyvinuta miniaturizovaná extrakční metoda pro rychlý screening netěkavých nitrososloučenin ve sladu pomocí plynové chromatografie s chemiluminiscenční detekcí specifickou pro nitrososloučeniny. Podle výsledné metody, byly vzorky připravovány extrakcí namletých sladových zrn ve směsi rozpouštědel pyridinu a acetonitrilu v poměru 60:40 (v/v). Pro zvýšení těkavosti stanovovaných analytů následovala dvoukroková derivatizace pomocí hexamethyldisalazanu a *N,O*-bis(trimethyl)-trifluoroacetamidu. Celkový objem vzorků činil 200 μ l a čas přípravy vzorků po optimalizaci činil 80 min.

Extrakční metoda byla spojena s klasifikační metodou, která chromatografické píky rozdělila do skupin *N*-nitrososloučenin, *C*-nitrososloučenin a interferujících látek. Po aplikaci obou metod na reálné vzorky sladu byly vytipovány konkrétní chromatografické píky *C*-nitrososloučenin a *N*-nitrososloučenin, jejichž vlastnosti a struktura budou studovány v následném výzkumu.

Klíčová slova

Nitrososloučeniny, slad, extrakce, derivatizace, plynová chromatografie, chemiluminiscenční detektor

Abstract

The aim of this diploma thesis was to develop a miniaturized extraction method for a fast screening of non-volatile nitroso compounds using gas chromatography with a nitroso specific chemiluminescence detection. According to a final methodology, the samples were prepared by extraction of grinded malt using a mixture of pyridine and acetonitrile in ratio 60:40 (v/v). To enhance volatility of the determined analytes, the two-step derivatization using hexamethyldisilazane and *N,O*-bis(trimethyl)-trifluoroacetamide was used. The total volume of the sample was 200 µl and the preparation time after optimization was in total 80 min.

The extraction method was connected to a classification method, which can divide chromatographic peaks into the groups of *N*-nitroso and *C*-nitroso compounds, and interfering substances. After application of the methods mentioned above to real malt samples, the specific chromatographic peaks of *C*-nitroso and *N*-nitroso compounds were selected. Description of their properties and structure suggestion will be a subject of the following study.

Keywords

Nitroso compounds, malt, extraction, derivatization, gas chromatography, chemiluminescence detector

Poděkování

Poděkování patří mé odborné konzultantce RNDr. Janě Olšovské, Ph.D. a odbornému konzultantovi Mgr. Tomáši Vrzalovi z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského (VÚPS) za odborné vedení a ochotu, kterou mi v průběhu vypracování diplomové práce věnovali.

Dále děkuji své školitelce RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty za příležitost vypracování experimentální části diplomové práce na VÚPS a za věcné poznámky a připomínky v rámci kontroly diplomové práce.

Obsah

Abstrakt	3
Abstract.....	4
Poděkování	5
Obsah	6
Seznam zkratek a symbolů	8
1 Teoretický úvod.....	9
1.1 Slad	10
1.1.1 Výrobasladuadruhysladů	10
1.1.2 Složení sladu	12
1.1.3 Nežádoucí látky sladu.....	13
1.2 Nitrososloučeniny	14
1.2.1 N-nitrosaminy	14
1.2.2 Ostatní nitrososloučeniny	16
1.2.3 Vznik nitrososloučenin	18
1.3 Metody stanovení nitrososloučenin	20
1.3.1 Extrakční metody.....	20
1.3.2 Separační metody.....	21
1.3.3 Stanovení ATNC.....	22
1.4 Chemiluminiscenční detektor selektivní pro nitrososloučeniny	23
1.4.1 Klasifikační metoda	24
2. Experimentální část	26
2.1 Chemikálie	26
2.2 Seznam vzorků.....	26
2.3 Přístrojové vybavení	26

2.4 Postup přípravy vzorků	27
2.5 Podmínky analýzy na GC-NCD	27
2.6 Zpracování dat	28
2.7 Postup kompletní screeningové metody	28
2.8 Příprava vzorků s vyšším množstvím nitroso-sloučenin	28
2.8.1 Příprava extraktu sladu nitrosovaného roztokem dusitanů	28
2.8.2 Příprava sladu nitrosovaného plynným oxidem dusičitým	29
3. Výsledky a diskuze	31
3.1 Vývoj extrakční metody	31
3.1.1 Test extraktivnosti vybraných analytů	32
3.1.2 Složení směsi extrakčního činidla	33
3.1.3 Volba úpravy vzorků před extrakcí	39
3.1.4 Optimalizace derivatizace	40
3.1.5 Kontrola klasifikační metody	43
3.2 Nitrosace sladu	44
3.2.1 Nitrosace extraktů sladu v roztoku dusitanů	44
3.2.2 Nitrosace sladu plynným oxidem dusičitým	46
3.3 Aplikace na reálné vzorky	47
Závěr	51
Bibliografie	52
Přílohy	59

Seznam zkratek a symbolů

ATNC	Koncentrace zdánlivých celkových nitrososloučenin (z ang. Apparent Total Nitroso Compounds)
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
GC	Plynová chromatografie (z ang. Gas Chromatography)
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z ang. High Performance Liquid Chromatography)
MS	Hmotnostní detektor (z ang. Mass Spectrometer)
NCD	Chemiluminiscenční detektor selektivní pro nitrososloučeniny (z ang. Nitroso Specific Chemiluminescence Detector)
NDBA	<i>N</i> -nitrosodibutylamin
NDEA	<i>N</i> -nitrosodiethylamin
NDiPA	<i>N</i> -nitrosodiisopropylamin
NDMA	<i>N</i> -nitrosodimethylamin
NDPA	<i>N</i> -nitrosodipropylamin
NDPhA	<i>N</i> -nitrosodifenylamin
NHPRO	<i>N</i> -nitrosohydroxyprolin
NMOR	<i>N</i> -nitrosomorfolin
NMU	<i>N</i> -nitroso- <i>N</i> -methylmočovina
NPIP	<i>N</i> -nitrosopiperidin
NPRO	<i>N</i> -nitrosoprolin
NPYR	<i>N</i> -nitrosopyrrolidin
NSAR	<i>N</i> -nitrososarkosin
NTCA	<i>N</i> -nitrosothiazolidin-4-karboxylová kyselina

1 Teoretický úvod

V České republice patří pivo mezi nejoblíbenější nápoj, a proto je třeba pečlivě sledovat jeho složení i kvalitu jeho surovin. Jelikož těkavé *N*-nitrosaminy, které byly v pivu nalezeny ve stopovém množství, představují vážné zdravotní riziko pro člověka [1], bylo v zájmu tyto látky podrobně studovat. Studium problematiky těkavých *N*-nitrosaminů v pivu a sladu bylo započato koncem 70. let minulého století, kdy byl v německých pivech nalezen *N*-nitrosodimethylamin (NDMA) v koncentracích až 68 µg/kg [2]. Později bylo zjištěno, že NDMA přechází do piva převážně ze sladu, ve kterém se tvoří během sladování [3]. V reakci na toto zjištění byla technologie sladování upravena tak, aby během ní vznikalo co nejméně těkavých *N*-nitrosaminů [4]. Za účelem kontroly, byla vyvinuta metoda stanovení těkavých *N*-nitrosaminů, která využívá vakuovou destilaci a následnou analýzu plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí nebo chemiluminiscenční detekcí selektivní pro nitrososloučeniny (NCD) [5]. Nejvyšší přípustná koncentrace NDMA v pivu je 0,5 µg/l a ve sladu 1,0 µg/kg. Tato doporučení byla vydaná Českým svazem pivovarů a sladoven a byla součástí dnes již zrušené vyhlášky č. 305/2004. Obecně se však tyto hranice stále dodržují.

Ve sladu jsou mimo těkavé *N*-nitrosaminy přítomny i další nitrososloučeniny, které jsou obecně netěkavé nebo jen málo těkavé. Tuto obsáhlou skupinu látek mohou tvořit *N*-nitrosamidy, *N*-nitrosoguanidiny a *C-/O-/S*-nitrososloučeniny [6]. Pro stanovení celkových nitroso skupin ve sladu i pivu se dodnes používá Waltersova metoda ATNC (Apparent Total Nitroso Compounds) využívající také NCD detekci [7]. Pro ATNC ve sladu i pivu podobná opatření jako pro těkavé *N*-nitrosaminy doposud neexistují, ale obvykle se za limitní koncentraci považuje 20 µg (N-NO) na kilogram sladu [8].

V dnešní době patří tyto dvě výše zmíněné metody stanovení k rutinním analýzám piva a sladu, které slouží převážně pro kontrolu správných technologických postupů. Pro potvrzení zdravotní nezávadnosti piva jsou však nedostačující. Dle výsledků měření na VÚPS z roku 2012 vyplývá, že NDMA v pivu tvoří 0,1-0,6 % celkového obsahu ATNC [9]. Dle výzkumu z r. 1987 tvoří NDMA 0,3-4,8 % celkového ATNC ve sladu [10]. Těkavé *N*-nitrosaminy přispívají k celkové koncentraci ATNC tedy pouze malým podílem a zbylou část tvoří nitrososloučeniny o neznámé struktuře. Zjištění struktury těchto látek by přispělo k přesnějšímu odhadu zdravotní nezávadnosti sladu a zejména jeho

nejoblíbenějšího produktu - piva.

Hlavním cílem diplomové práce bylo vyvinout rychlý extrakční postup pro screening nitrososloučenin ve sladu pomocí plynové chromatografie s chemiluminiscenční detekcí. Úkolem bylo najít vhodné extrakční činidlo pro extrakci převážně netěkavých nitrososloučenin. Netěkavé nitrososloučeniny kromě funkční nitroso skupiny mohou obsahovat i další polární skupiny (-OH, -SH, , -CHO, -NH₂, -COOH, -CONH₂), z toho důvodu bylo nutné nalézt i vhodné derivatizační činidlo. Aby bylo zabráněno derivatizaci polárních skupin pocházejících z rozpouštědla, bylo potřeba vyvinout extrakci za použití polárních aprotických rozpouštědel. V souvislosti s ochranou životního prostředí by metoda měla být miniaturizovaná, aby bylo dosaženo minimální spotřeby organických rozpouštědel.

K detekci analytů byl použit specifický NCD detektor. Bylo zjištěno, že odezva detektoru na konkrétní nitrososloučeniny se liší v závislosti na pyrolyzní teplotě [11]. Na vybrané vzorky sladů proto byla aplikována detekční metoda, pomocí které byly nitrososloučeniny klasifikované do konkrétních podskupin: C-nitrososloučeniny, N-nitrososloučeniny, C-nitroso/nitrososloučeniny a byly odlišeny od interferencí [11]. Vybrané klasifikované nitrososloučeniny nadále poslouží jako podklad pro další výzkum, který se bude podrobněji zabývat jejich identifikací.

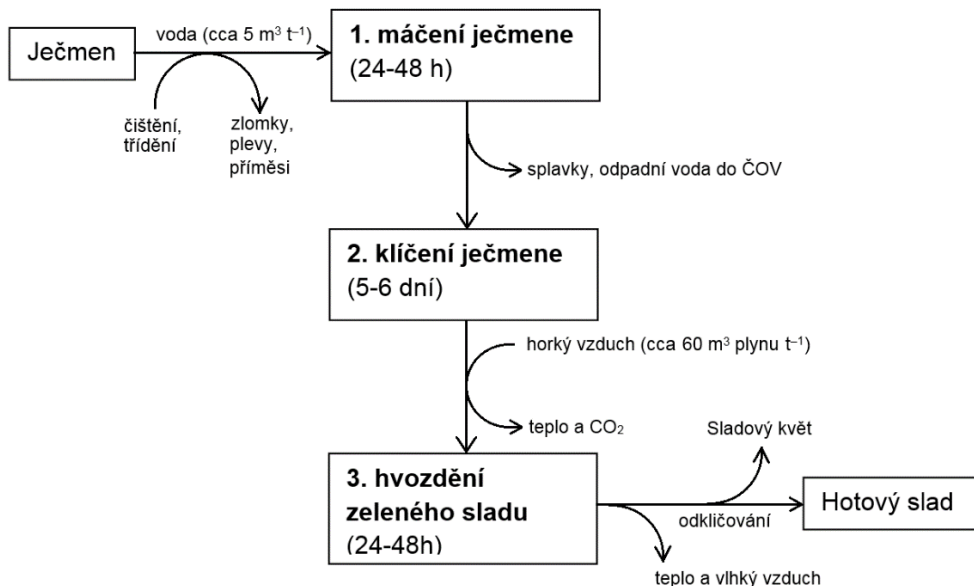
1.1 Slad

Slad je jednou z hlavních přísad pro výrobu piva. Nejvíce se slad vyrábí z ječmene setého (*Hordeum sativum*, L., lipnicovité, *Poaceae*) [12]. Existují však i slady z jiných druhů obilovin, např. pšeničné slady, které jsou hojně vyráběny například v Belgii a Německu [13].

1.1.1 Výroba sladu a druhy sladů

Princip sladování spočívá v naklíčení a usušení ječmene za kontrolovaných podmínek. Jednoduché schéma výroby sladu je zobrazeno na **Obr. 1.1.1**. V prvním kroku je sladovnický ječmen očištěn a smáčen po dobu 24-48 h. Namočený ječmen dále klíčí 5-6 dní. Podmínky máčení a klíčení dávají sladu specifické vlastnosti, kterými jsou například kyselost sladu a redoxní potenciál [14]. V endospermu ječmene dochází k řadě fyzikálně-chemických změn. Enzymy uvolněné ze zárodku a kořínků rozkládají škrob

v endospermu na nižší sacharidové jednotky. K rozluštění endospermu dochází od kořínku postupně podél celé délky zrna, a proto lze dobou klíčení ovlivňovat míru jeho rozluštění. V dobře rozluštěném endospermu jsou škrobová zrna lépe přístupná působení amylolytických enzymů při varném procesu.



Obr. 1.1.1: Schéma výroby sladu (zdroj [14])

Během hvozdění je slad kontrolovaně sušen po dobu až 48 h a tím je enzymatický proces ukončen. Během hvozdění nejvíce vznikají látky aromatické a barevné [12]. Různé druhy sladů jsou vyráběny úpravou technologických podmínek máčení, klíčení i hvozdění a výběrem odrůdy sladu. Změna podmínek klíčení a máčení zajistí sladům především různou míru rozluštění vysokomolekulárních látek, čímž ovlivní např. křehkost zrna. Úprava podmínek hvozdění naopak určuje množství vody ve výsledném sladu, či tvorbu aromatických a barevných látek [14].

Na výrobu běžných výčepních pív, ležáků i pív speciálních se používá světlý *slad plzeňského typu*. Vyrábí se při teplotě hvozdění 80-85 °C a je typický nízkou hodnotou barvy kongresní sladiny. Dalším běžně používaným sladem je *slad mnichovského typu*, který se vyrábí při teplotě hvozdění 100-105 °C, má vyšší hodnotu barvy kongresní sladiny a silnější aroma. Dále jsou vyráběny *slady speciální*, které se přidávají k běžným sladům pro zvýraznění jejich určitých charakteristických vlastností. Často se tyto speciální slady liší enzymovou aktivitou, redoxním potenciálem, kyselostí nebo barvou. Mezi speciální slady se řadí karamelový slad, barvicí (čokoládový) slad, nakuřovaný slad, melanoidinový slad, diastatický slad, proteolytický (kyselý) slad či slad zvyšující redoxní kapacitu piva

[14]. Karamelový slad se vyrábí při teplotách hvozdění 120-180 °C, má vysoký obsah aromatických a barevných látek a je silně hygroscopický [12].

1.1.2 Složení sladu

Složení sladu je důležité kritérium ovlivňující jeho chemické a biochemické vlastnosti, které jsou důležité pro správnou výrobu piva. U sladu se určuje řada kvalitativních znaků buď přímo analýzou sladového zrna či analýzou jeho kongresní sladiny [12]. Prvním sledovaným kritériem je *vlhkost* sladu, která by měla být maximálně 6 %. Vlhkost světlých sladů bývá kolem 3,5 % a u tmavých sladů až 2 %. Příliš vlhký slad je náchylnější k rozmnožení mikrobiální kontaminace nebo může vykazovat nižší extraktivnost. *Extraktivnost* sladu je dalším kritériem, především ekonomickým a má vliv na výsledky kvašení či chemické a organoleptické vlastnosti výsledného piva [14].

Endosperm sladu je tvořen malými škrobovými zrny (\varnothing 1-5 μm) a velkými škrobovými zrny (\varnothing 25-30 μm); jejich zastoupení je dané geneticky [14]. Škrobová zrna jsou z 98 % tvořena chemicky čistým škrobem (amylosou a amylopektinem) a zbytek tvoří neškrobové polysacharidy, lipidy a dusíkaté látky [12]. *Neškrobové polysacharidy* tvoří 10-14 % ječného zrna a patří mezi ně celulóza a hemicelulóza. Celulóza zpevňuje buněčné stěny a je obsažena především v pluchách sladu. Hemicelulóza pak slouží jako zpevňující a vyplňující látka v prostoru mezi celulosovými vlákny. Podíl neškrobových polysacharidů v hotovém sladu je různý, jelikož je závislý nejen na genetických vlastnostech sladu, tak i na technologii sladování. Obecně však platí, že jejich podíl během sladování klesá. *Lipidy* sladu tvoří poměrně různorodá skupina: mastné kyseliny, lipoproteiny, fosfolipidy, acylglyceroly, lipopolysacharidy a doprovodné látky lipidů - steroly. Tyto látky jsou důležité pro správný metabolismus pivovarských kvasinek a jejich obsah v ječmeni bývá kolem 4,5 %. Během sladování se podíl lipidů příliš nemění [14].

Ve sladu je dále přítomna řada *dusíkatých látek*, od vysokomolekulárních proteinů přes polypeptidy až po jednoduché aminokyseliny [12]. Během klíčení ječmene dochází ke štěpení proteinů, čímž stoupá podíl polypeptidů a aminokyselin ve sladu. Některé dusíkaté látky sladu mají příznivý vliv na pěnivost a stabilitu pěny, plnost chuti a barvy piva. Jednoduché aminokyseliny dávají příznivé prostředí pro množení a metabolismus pivovarských kvasinek během kvašení.

V pluchách a aleuronové vrstvě ječného i sladového zrna jsou dále přítomny

polyfenoly, mezi které patří například flavonoidy či fenolové kyseliny. Polyfenoly tvoří různorodé látky, které mohou pozitivně ale i negativně ovlivňovat vlastnosti výsledného piva [14]. Pozitivní vliv mají například nezoxidované formy či volné fenolové kyseliny, které mají přirozeně antioxidační účinky a oddalují stárnutí chuti piva [15]. Negativní účinky způsobují naopak zoxidované polyfenoly, které zhoršují chuť piva [16].

1.1.3 Nežádoucí látky obsažené ve sladu

Ve sladu se může nacházet řada látek, které buď zhoršují organoleptické vlastnosti piva (např. sirné látky), nebo jsou dokonce ve vyšších koncentracích zdraví škodlivé (např. mykotoxiny, akrylamid, toxické kovy a *N*-nitrosaminy) [14].

Sirné látky již ve stopovém množství mohou zhoršovat senzorickou kvalitu piva, do kterého se mohou dostat z ječmene i chmele. Nejznámějším a nejvíce sledovaným zástupcem této skupiny látek je dimethylsulfid, který je složkou pивní vůně [17]. Je-li však jeho koncentrace v pivu vyšší než 35-40 µg/l, výrazně se tím zhoršují senzorické vlastnosti piva [18].

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity mikroskopických hub (např. houby rodu *Fusarium*) a jsou přírodními toxiny pro živé organismy včetně člověka [19]. Výskyt mykotoxinů ve sladovnickém ječmeni je ovlivněn náchylností odrůdy ječmene, způsobem pěstování ale i posklizňovou úpravou a skladováním. Mykotoxiny jsou schopny z nakaženého ječmene přejít skrze sladovací i varný proces až do piva [20] a proto jsou tyto látky přísně kontrolovány příslušnými státními orgány [14]. Další karcinogenní a mutagenní látkou je *akrylamid*, který nejvíce vzniká ve sladu při teplotách hvozdění 150-170°C [21]. Je proto převážně přítomen ve speciálních sladech [14]. Vzniká v průběhu Maillardovy reakce, tj. reakce mezi redukcujícími cukry a aminokyselinami. Touto reakcí vzniká hnědý odstín sladu, jehož intenzita roste s rostoucí teplotou hvozdění [22]. *Toxické kovy* mohou ve sladu pocházet ze samotného ječmene, máčecí vody či z technologického zařízení. Převážně se koncentrují ve sladovém květu a do samotného piva přechází pouze v zanedbatelném množství, i přesto je nutné tyto látky sledovat [23].

Mezi další významné karcinogenní a mutagenní látky sladu patří těkavé *N*-nitrosaminy. V surovém ječmeni se těkavé *N*-nitrosaminy přirozeně nevyskytují [14] a jednou z možných cest kontaminace ječmene nitrososloučeninami by mohlo být použití herbicidů či pesticidů na ochranu rostlin [24]. Nebylo však dokázáno, že by běžné

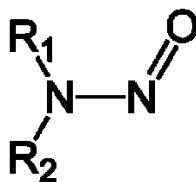
pesticidy a dusíkatá hnojiva, používaná během vegetačního období sladového ječmene, měly významný vliv na množství těkavých *N*-nitrosaminů v hotovém sladu [25]. Bylo zjištěno, že těkavé *N*-nitrosaminy nejvíce vznikají během hvozdní sladu, především při používání otevřených hořáků [3]. Proto byly dále hledány optimální technologické podmínky hvozdní [26] i klíčení [27], s cílem snížit tvorbu těkavých *N*-nitrosaminů. *N*-nitrosaminy obecně spadají do skupiny nitrososloučenin, avšak zbylým nitrososloučeninám, vyskytujícím se ve sladu, nebylo doposud věnováno příliš pozornosti.

1.2 Nitrososloučeniny

Nitrososloučeniny jsou látky obsahující ve své chemické struktuře charakteristickou skupinu -NO. Podle toho k jaké molekule je nitrososkupina vázána, rozlišujeme *C*-/*N*-/*S*-/*O*-nitrososloučeniny. Skupinu *N*-nitrososloučenin lze rozdělit na *N*-nitrosamidy a *N*-nitrosaminy. Řada *N*-nitrosaminů byla nalezena v potravinách [28], [29], v kosmetice [30], v pitné vodě [31], [32] a také v pivu a sladu [2], [33]. V těchto produktech většinou vznikají během výrobního procesu, např. po přidání konzervačních látek nebo tepelným zpracováním [34]. Skupinu *N*-nitrosamidů tvoří například *N*-nitrosokarbamáty a *N*-nitrosoguanidiny, které však zatím nebyly v potravinách stanoveny [34]. Důvodem může být jejich nízká stabilita, a proto nemohou být v konečném potravinovém výrobku detekovatelné [35]. Mezi ostatní, převážně netěkavé nitrososloučeniny, lze dále zařadit *N*-nitroso deriváty glykosylaminů a Amadoriho sloučenin, *N*-nitrosované substituované indoly nebo *C*-/*S*-nitrososloučeniny [36].

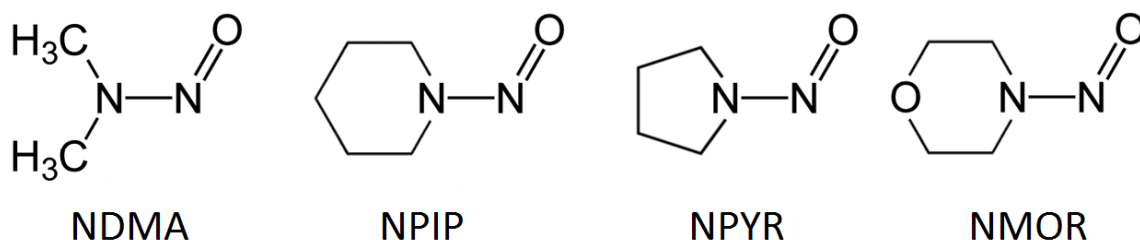
1.2.1 *N*-nitrosaminy

N-nitrosaminy jsou obecně *N*-nitrosované sekundární aminy, jejichž obecná struktura je zobrazena na **Obr. 1.2.1**. Na základě rozdílné tenze par jsou *N*-nitrosaminy dále děleny na těkavé a netěkavé. Těkavé *N*-nitrosaminy mají substituenty R_1 a R_2 tvořeny nepolárními krátkými alifatickými řetězci či jednoduchým heterocyklem a netěkavé naopak obsahují dlouhé uhlovodíkové řetězce s navázanými polárními skupinami (-OH, -SH, -NH₂ nebo -COOH) [34].



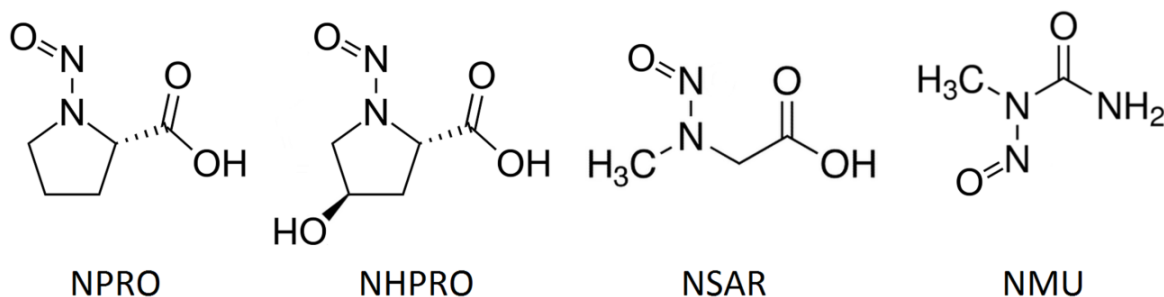
Obr. 1.2.1: Obecná struktura *N*-nitrosaminů

Nejvýznamnějším zástupcem **těkavých *N*-nitrosaminů** je *N*-nitrosodimethylamin (NDMA), který byl v pivu stanoven již koncem 70. let [2]. Dalšími zástupci, nalezenými v pivu či sladu, jsou *N*-nitrosodiethylamin (NDEA) [2], *N*-nitrosopiperidin (NPIP) a *N*-nitrosopyrrolidin (NPYR) [37]. V jiných matricích byly dále stanoveny *N*-nitrosodifenylamin (NDPhA) [31], *N*-nitrosodipropylamin (NDPA), *N*-nitrosodibutylamin (NDBA), a *N*-nitrosomorfolin (NMOR) [38], [39]. Struktury vybraných zástupců jsou zobrazeny na **Obr. 1.2.2**.



Obr. 1.2.2: Struktury vybraných těkavých *N*-nitrosaminů

Netěkavé *N*-nitrosaminy obecně tvoří *N*-nitrosoaminokyseliny, *N*-nitrosované heterocyklické karboxylové kyseliny a *N*-nitrosomočoviny. Nejvýznamějšími zástupci jsou *N*-nitrosoprolin (NPRO), *N*-nitrosohydroxyprolin (NHPRO), *N*-nitrososarkosin (NSAR), *N*-nitrosothiazolidin-4-karboxylová kyselina (NTCA) nebo *N*-nitroso-*N*-methylmočovina (NMU) [34]. Struktury těchto zástupců jsou zobrazeny na **Obr. 1.2.3**.



Obr. 1.2.3: Struktury vybraných netěkavých *N*-nitrosaminů

Těkavé *N*-nitrosaminy jsou látky s prokázanými karcinogenními a mutagenními

účinky [1]. Výzkum Helguera a kol. [40] studoval vztah mezi strukturou molekuly (druh a symetrie substituentů R_1 a R_2) na karcinogenní aktivitu látky. Bylo zjištěno, že ke karcinogenitě pozitivně přispívají zejména krátké nesubstituované uhlovodíkové zbytky a opačný efekt dávají polární substituenty (hydroxyly, karboxyly) či nenasycené uhlovodíkové zbytky. Tato studie je v souladu s obecnými poznatky o nízké nebo žádné karcinogenitě netěkavých *N*-nitrosaminů [34].

Odbourávání *N*-nitrosaminů probíhá v játrech, kde dochází k jejich aktivaci oxidačními enzymy [41]. V prvním kroku podléhají oxidaci na α -uhlíku za vzniku aldehydu a nestabilního diazohydroxidu. Diazohydroxid se dále rozkládá na diazoniový ion a dále na karbokation způsobující mutaci DNA [42]. Je-li na α -uhlíku přítomen substituent, k aktivaci nedochází a látka není pro organismus toxická [40]. Tento proces odbourávání *N*-nitrosaminů se shodoval na všech testovaných savcích a předpokládá se tak i stejný průběh u lidí [35].

Skupinu netěkavých *N*-nitrosaminů tvoří různorodé látky, které jsou obecně považovány za méně toxické. Jednoduchými reakcemi se však někteří zástupci mohou přeměnit na látky toxičtější. Příkladem jsou netěkavé *N*-nitrososarkosin a *N*-nitrosoprolin, které dekarboxylací za vysokých teplot dávají vzniknout těkavým *N*-nitrosodimethylaminu a *N*-nitrosopyrrolidinu [43]. Dalším příkladem je translokační reakce *N*-nitrosoprolinu a *N*-methylmočoviny za přítomnosti thiomčoviny v kyselém prostředí, při které vzniká mutagenní *N*-nitroso-*N*-methyl močovina [44].

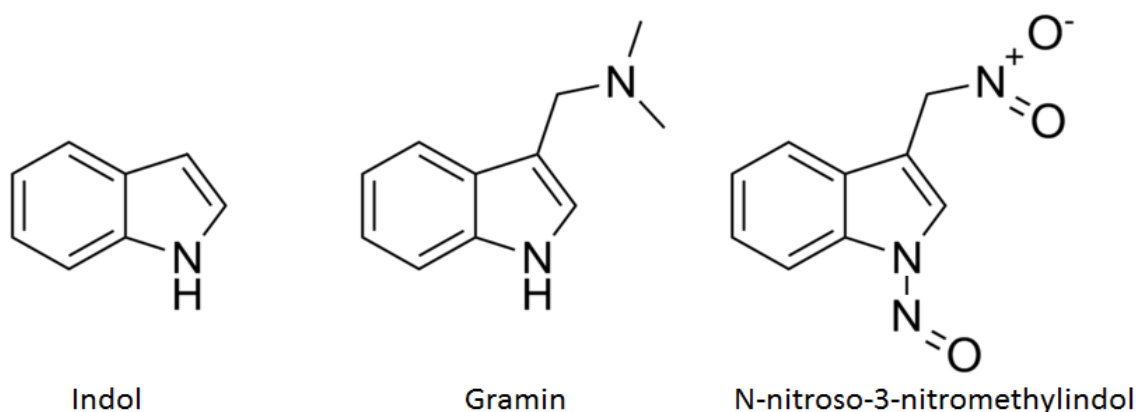
1.2.2 Ostatní nitrososloučeniny

Zbylou část netěkavých nitrososloučenin však tvoří mnoho dalších rozmanitých struktur, které doposud nebyly dostatečně charakterizovány [8].

Netěkavé nitrososloučeniny sladu mohou tvořit i *N*-nitrosoderiváty glykosylaminů a Amadoriho sloučenin. Glykosylaminy a Amadoriho sloučeniny (deriváty aminodeoxy-sacharidů) jsou meziprodukty Maillardovy reakce, což je reakce redukcí sacharidů s aminy, která probíhá při vysokých teplotách během hvozdění sladu. Řada Amadoriho sloučenin a glykosylaminů byla stanovena ve světlém i tmavém sladu. Tmavý slad obecně obsahuje více Amadoriho sloučenin důsledkem vyšší teploty hvozdění [45]. Byl studován vznik *N*-nitrosoderivátů Amadoriho sloučenin a glykosylaminů během Maillardovy reakce za přítomnosti oxidů dusíku na masných produktech [46]. Během hvozdění je slad také v přímém kontaktu s oxidy dusíku sušícího vzduchu a z toho důvodu nelze vyloučit jejich

přítomnost i ve sladu. *N*-nitrosoderiváty glykosylaminů a Amadoriho sloučenin byly uměle syntetizovány a vykazovaly přímé mutagenní účinky [47]. Mutagenní aktivita je závislá na struktuře aminu, sacharidu i na přítomnosti hydroxylových skupin. Tyto deriváty podléhají v organismu hydrolytickému štěpení za vzniku arenodiazoniového kationtu, který způsobuje mutaci DNA.

Další zástupce mohou tvořit *N*-nitrosoderiváty indolů, heterocyklických aromatických sloučenin vznikajících během klíčení rostlinného semene. Indoly a jeho deriváty podléhají nitrosačním reakcím za poměrně mírných podmínek a podle druhu substituentů na C-3 uhlíku mohou tvořit různé produkty nitrosace [34]. Například nitrosací graminu (derivátu indolu přirozeně přítomném ve sladu) za kyselých podmínek vzniká nejen těkavý NDMA, ale i netěkavý *N*-nitroso-3-nitromethylindol [48], který je zobrazen na **Obr. 1.2.4**. Mutagenní účinek *N*-nitrosoindolů na nukleotidy DNA je založen na přenosu nitrososkupiny na nukleofilní skupiny purinové báze [49].



Obr. 1.2.4: Struktura indolu a jeho derivátů

C-nitrososloučeniny sladu jsou pravděpodobně tvořeny *C*-nitrosovanými polyfenoly [50] a jsou obecně považovány za netoxické látky [35]. Nitrosace polyfenolů probíhá za kyselých podmínek [51]. Polyfenoly reagují s nitrosačními činidly přednostně, čímž inhibují tvorbu *N*-nitrosaminů. Například kyselina kofeinová a ferulová inhibovaly vznik NDMA [52], nebo polyfenoly v čajových listech a kávé inhibovaly nitrosaci methylmočoviny [53]. Za bazických podmínek však mohou *N*-nitrosaci i katalyzovat [54]. Například di-/trihydroxy fenoly a další fenolové sloučeniny katalyzovaly vznik NDEA [55]. Byla provedena nitrosace tyraminu (derivátu tyrosinu), při které vznikaly buď *N*-nitroso nebo *C*-nitroso produkty [56]. Za podmínek pH podobným v žaludku probíhala přednostně *C*-nitrosace na aromatické jádro, jehož produktem však byla mutagenní látka.

S-nitrososloučeniny sladu vznikají nitrosací thiolů a dále mohou podléhat *trans*-nitrosační reakci za vzniku *N*-nitrosaminů [54]. Z 1-thiosacharidu bylo připraveno několik derivátů *S*-nitrososloučenin [57]. Kromě *S*-nitroso-1-thio-2,3,4,6-tetra-*O*-acetylglukopyranózy byly všechny nestabilní v pevné fázi i v roztoku. *S*-nitrososloučeniny jsou obecně považovány za netoxické látky [35] s vazodilatačními účinky (rozšiřuje cévy) [57].

1.2.3 Vznik nitrososloučenin

Nitrososloučeniny mohou v potravinářských výrobcích vznikat několika možnými způsoby: přidáním dusičnanů, dusitanů nebo jiných konzervantů do procesu výroby, tepelnou úpravou (kouřové uzení nebo sušení spalovacími plyny) a mikrobiální kontaminací [34]. Ve sladu vzniká nejvíce nitrososloučenin během procesu hvozdění, kdy je slad v přímém kontaktu se sušícím vzduchem, obsahujícím oxidy dusíku. V minulosti technologie sladování využívala sušení nad přímými hořáky, které byly příčinou vysoké koncentrace NDMA ve sladu [4]. Použitím nepřímých hořáků či sušení za nižších teplot pak vedlo k menší produkci NDMA i dalších těkavých *N*-nitrosaminů [3]. Studie Čulíka a kol. [25] potvrdila, že v ječmeni a zeleném sladu byla koncentrace NDMA nižší než v hotovém sladu.

Z chemického hlediska nitrososloučeniny vznikají reakcí přirozených prekurzorů sladu s oxidy dusíku. Nitrosační reakce může být ovlivněna řadou faktorů, kterými jsou: množství a druh nitrosačního činidla a prekurzorů, hodnota pH prostředí či přítomnost katalyzátoru nebo inhibitoru [3].

Oxidy dusíku jsou nitrosační činidla, která vznikají ve spalovacím procesu reakcí kyslíku s dusíkem za vysokých teplot. Kyslík je získán hlavně z okolního vzduchu, zatímco dusík pochází z různých zdrojů, jako je použité palivo či olej [4]. Oxidy dusíku tvoří směs o různém oxidačním stupni dusíku, ale pouze oxid dusitý a oxid dusičitý jsou nitrosačními činidly. Dusitanové ionty nejsou přímými nitrosačními činidly, avšak v kyselém roztoku částečně přecházejí na oxid dusičitý [3].

Přirozenými prekurzory těkavých i netěkavých *N*-nitrosaminů jsou především sekundární a terciální aminy, které jsou přítomné v zeleném sladu a vznikají během klíčení ječmene [58]. Příkladem jsou alkaloidy hordenin a gramin, které jsou prokázanými prekurzory dimethylaminu, jehož nitrosací vzniká NDMA [59]. Nitrosací primárních aminů s jednou aminoskupinou vznikají alkoholy, má-li však molekula dvě aminoskupiny mohou vznikat cyklické *N*-nitrosaminy.

Mechanismem vzniku netěkavých nitrososloučenin se zabývalo pouze několik prací [8] [43]. Jednou z možností vzniku netěkavých *N*-nitrosaminů jsou translokační reakce nitrososkupiny mezi dvěma různými molekulami [3]. Kondenzačními reakcemi aminokyselin (cystein, serin, threonin nebo tryptofan) s jednoduchými aldehydy (formaldehyd nebo acetaldehyd) mohou vznikat *N*-nitrosované heterocyklické karboxylové kyseliny, například NTCA vzniká kondenzací cysteinu a formaldehydu [34]. Další možností je přímá nitrosace aminokyselin, kdy např. NPRO a NHPRO mohou vznikat přímo z prolinu nebo 4-hydroxyprolinu [60]. V obilných semenech je přítomen kreatin, který dává vzniku sekundárnímu aminu sarkosinu, jehož nitrosací vzniká netěkavý NSAR [3]. Dalším příkladem je vznik *N*-nitrosopipekolové kyseliny, která vzniká z aminokyseliny lysinu [61].

Významným faktorem ovlivňujícím průběh nitrosační reakce je pH prostředí. Nitrosace prolinu probíhá při pH 2-2,5; piperidinu a morfolinu při pH 3, dimethylaminu při pH 3-4 a nitrosace graminu a hordeninu při pH 4,4 [3]. Také oxidy dusíku jsou závislé na pH prostředí, jelikož rozhoduje o dominanci konkrétní formy oxidu dusíku. Pro nitrosační reakci je optimální rozmezí pH 2-5, kdy má největší zastoupení právě oxid dusitý a oxid dusičitý. Dalším důležitým faktorem je i pK_a daného aminu [54].

Katalyzátory nitrosačních reakcí mohou být slabé kyseliny, karboxylové sloučeniny a obecně nukleofilní anionty, např. jodidy, bromidy, chloridy a thiokyanatany [35]. Katalyzátory nitrosace sekundárních aminů mohou být například formaldehyd či benzaldehyd [34].

Známými inhibitory nitrosačních reakcí jsou naopak fenoly, jelikož reagují přednostně s oxidy dusíku za vzniku nitrofenolu a nitrosofenolu. I další aromatické a heterocyklické sloučeniny jako kyselina askorbová (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E) a kyselina amidosulfonová reagují s nitrosačními činidly přednostně, čímž inhibují vznik *N*-nitrosaminů [62]. Hordenin, který je dle struktury také fenol, může být v kyselém prostředí inhibitorem. Kyselina kávová, kyselina ferulová a katechin dobře inhibují nitrosaci dokonce při pH 5,5. Bylo zjištěno, že při inhibici hrají důležitou roli 3,4-dihydroxyskupiny na fenolech a konjugované olefinové vazby s volnými karboxylovými skupinami [63]. Oxid siřičitý má též inhibiční účinky, jelikož redukuje oxidy dusíku na méně aktivní formy – oxid dusnatý a oxid dusný. V minulosti se do sladovacího procesu přidávala kyselina sírová, která přecházela na oxid siřičitý.

Tato metoda inhibice však není šetrná k životnímu prostředí, a proto byla v některých státech zakázána [4]. Navíc, tento druh inhibice zabraňoval pouze vzniku těkavých *N*-nitrosaminů a neměl vliv na vznik netěkavých *N*-nitrosaminů [10].

Do piva se těkavé *N*-nitrosaminy mohou dostat dvěma možnými způsoby: prvním způsobem je nitrosace prekurzorů ze vstupních surovin během varního procesu, což dává vzniknout hlavně těkavým *N*-nitrosaminům. Druhým způsobem je bakteriální kontaminace během vaření piva [34]. Je-li varný proces kontaminován redukujícími bakteriemi, mohou pak být dusičnanové ionty, přítomné ve vodě, zredukovány na ionty dusitanové, které reagují s vhodnými prekurzory za vzniku těkavých i netěkavých *N*-nitrosaminů [64]. Při zkoumání vzniku netěkavých nitrososloučenin během varního procesu piva bylo zjištěno, že nejvíce nitrososloučenin vznikalo během procesu kvašení. Podíl netěkavých nitrososloučenin ze sladových meziproduktů (sladiny a mladiny) byl zanedbatelný [65].

1.3 Metody stanovení nitrososloučenin

Nitrososloučeniny, zejména *N*-nitrosaminy, byly stanoveny v masných produktech [28], v tabákových výrobcích [66] [67], v kosmetických přípravcích [30] [68], v pitné vodě [32] [31], příp. i v odpadní vodě [69] [38] [70]. Z alkoholických nápojů byly detekovány v červeném vínu [71], whiskey [72] a zejména v pivu [67] [72] a sladu [73] [74]. Metody stanovení většinou zahrnovaly extrakční kroky, následovanou separací analytů pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie.

1.3.1 Extrakční metody

Extrakční postupy pro stanovení těkavých *N*-nitrosaminů musely být přizpůsobeny matici a vykazují tak vysokou variabilitu. Díky jejich vysoké těkavosti mohou být vzorky připravovány extrakcí na pevné fázi nebo vakuovou destilací. Pro stanovení těkavých *N*-nitrosaminů v kapalně matici byla použita extrakce na pevné fázi s polymerním nosičem [33], s kokosovým uhlím [75] či metoda headspace [71], vše bylo spojeno s plynovou chromatografií. S kapalinovou chromatografií byla spojena extrakce na pevné fázi s polymerním nosičem [31] [70], s aktivním uhlím [69] či kokosovým uhlím [32]. Pro stanovení těkavých *N*-nitrosaminů v pevné matici se standardně využívají vakuové destilační metody [76] [25]. Dále byly vyzkoušeny pokročilé extrakční techniky, jako například superkritická fluidní extrakce [77], mikrovlnná extrakce [78], spojení

mikrovlonné a disperzní extrakce [79] nebo mikroextrakce na pevné fázi s pomocným zařízením pro přímou extrakci z pevných vzorků [80]. Většinu z těchto extrakčních technik je třeba doplnit poextrakčním čištěním; například pro odstranění lipidů byla použita extrakce hexanem [73] nebo heptanem [29].

Pro stanovení netěkavých *N*-nitrosaminů, konkrétně NSAR a NPRO v pivu a sladu byla použita extrakce kapalina-kapalina s čištěním na extrakčních kolonkách. Průměrná koncentrace NPRO činila 24,1 ppb (od 5,6-113,3 ppb) a průměrná koncentrace NSAR 1,7 ppb (<1,0-6,0 ppb) v pivu i ve sladu [73]. Ve výzkumné laboratoři na VÚPS byla vyvinuta metoda stanovení NPRO a NSAR ve sladu plzeňského, mnichovského a pšeničného typu extrakcí s ethylacetátem. Průměrná koncentrace NPRO ve sladu činila $13,2 \pm 2,9$ ppb a koncentrace NSAR byla pod limitem detekce, který byl 4,0 ppb [81]. Běžným postupem je přidavek standardu a látky potlačující nitrosaci. Pro potlačení nitrosační reakce jsou využívány např. kyselina amidosulfonová a sulfamát amonný [73]. Kvantifikace se v obou případech provádí přes kalibrační přímku interního standardu [35]. Tyto metody jsou obecně časově náročné a produkují velké množství organického odpadu.

1.3.2 Separační metody

Nejčastěji se ke stanovení těkavých i netěkavých *N*-nitrosaminů využívá plynová chromatografie s chemiluminiscenční detekcí selektivní pro nitrosaminy (GC-NCD) [82] [76]. Další časté zapojení je s hmotnostním detektorem (GC-MS) [79] [80], které bylo vyzkoušeno i v tandemovém uspořádání (GC-MS/MS) [30] [83]. Spojení GC-MS se nejvíce používá pro stanovení *N*-nitrosaminů ve vodě, pro komplexní matrice je nevhodné. Hmotnostní detekce nízkomolekulárních látek jako NDMA vykazuje nedostatečná spektra, jelikož molekulární ion je příliš malé hmoty a intenzity, a proto se dává přednost NCD detekci [35]. Dalším možným zapojením s plynovou chromatografií byl například plamenově-ionizační detektor [39].

Stanovení těkavých *N*-nitrosaminů pomocí plynové chromatografie vyžaduje pouze krátký čas analýzy a jako stacionární fáze je využíván středně polární sorbent. Z důvodu jejich vysoké těkavosti není nutná jejich derivatizace [35]. Pro stanovení netěkavých *N*-nitrosaminů je předchozí derivatizace nutná, pro snížení výparné teploty a zvýšení stability molekul. Derivatizace se obvykle provádí převedením polárních skupin na methyl estery pomocí diazomethanu [43] [73] nebo na trimethylsilyl estery pomocí

N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA) [74]. Jako katalyzátor derivatizační reakce lze použít např. kyselinu trifluoroctovou [84].

S klasickou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií byl zapojen hmotnostní detektor (HPLC-MS) [70] i v tandemovém uspořádání (HPLC-MS/MS) [29] [31] [32], a tyto metody umožnily stanovení těkavých i netěkavých *N*-nitrosaminů současně [29] [31]. Dále byl použit i reduktivní elektrochemický detektor [37] nebo fluorescenční detektor [67]. Spojení HPLC-NCD je náročné z důvodu nutnosti zmlžení velkého objemu mobilní fáze v pyrolyzátoru detektoru. Z toho důvodu musí být na výstupu z kolony připojeno několik vymrazovačů, které zkondenzují veškeré látky kromě nitroso radikálů, které putují až do speciální pyrolyzní pece [35]. Takovéto spojení bylo využito pro stanovení těkavých *N*-nitrosaminů v potravinách a nápojích [85].

1.3.3 Stanovení ATNC

Stanovení ATNC (Apparent Total Nitroso Compounds) udává koncentraci celkových nitrososkupin ve vzorku. Princip metody stanovení je následující: v prvním kroku jsou funkční nitrososkupiny od zbytku molekuly štěpeny pomocí kyseliny bromovodíkové v ledové kyselině octové. Vzniklý produkt nitrosylbromid je v pyrolyzní peci při teplotě 500 °C štěpen na nitrosylové a bromidové radikály, které v reakční komůrce detektoru reagují s ozonem za vzniku excitovaného oxidu dusičitého. Relaxací excitovaného oxidu dusičitého je vyzařeno charakteristické záření, které je detekováno na chemiluminiscenčním detektoru. Samotné měření je prakticky velmi náročné a odezva detektoru závisí na mnoha dalších faktorech, jako např. obsah vody ve vzorku, rychlost průtoku nosného plynu a kvalitě vymrazovacích lázní; stejně tak je i důležitá vysoká čistota použitých chemikálií [35].

Stanovení celkových nitrososloučenin u některých potravinových výrobků, jako jsou masné produkty, sójová omáčka a pitná voda, využívaly upravené metody ATNC. Například byla použita denitrosační směs jodu a jodidu draselného v kyselém prostředí [86]. Jiná varianta využívala směs chloridu měďného v kyselině chlorovodíkové [87].

Vysoký obsah ATNC v pivu bývá v dnešní době způsoben mikrobiální kontaminací. Kontaminované pivo má vyšší podíl biogenních aminů, které mohou být přímými prekurzory i netěkavých *N*-nitrosaminů [61]. Řádově stovkové hodnoty ATNC zpravidla svědčí o mikrobiální kontaminaci v některé fázi pivovarského provozu [50].

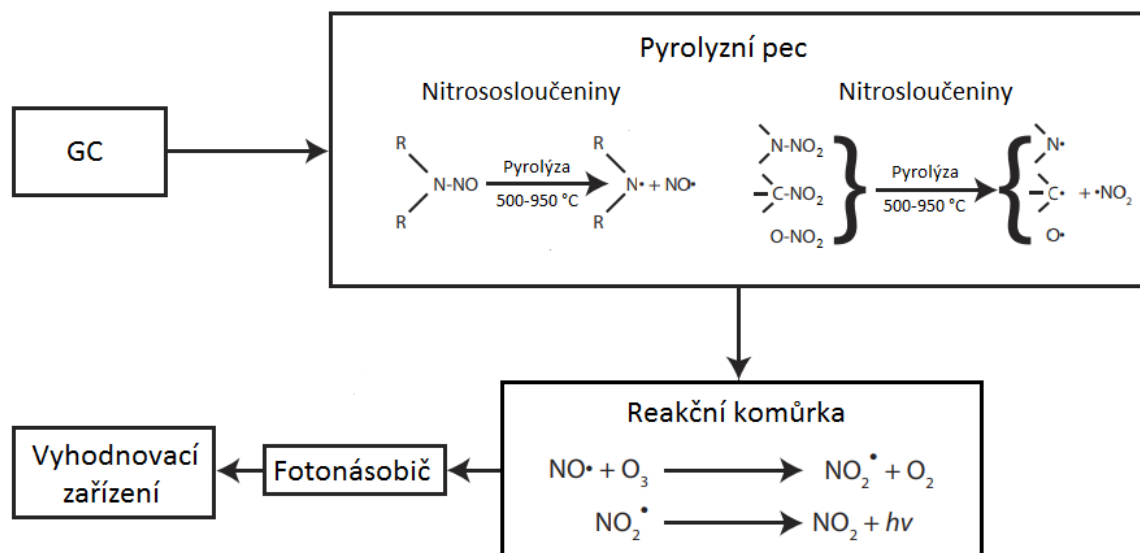
Metoda ATNC slouží jako alternativní stanovení netěkavých nitrososloučenin. Koncentrace ATNC je vyjádřena v jednotkách $\mu\text{g}(\text{N-NO})$ na kilogram sladu, příp. na litr piva, a udává tedy pouze sumu skupin N-NO od všech přítomných těkavých i netěkavých *N*-nitrosaminů a dalších nitrososloučenin, které se obecně považují za zdravotně nezávadné. Struktura jednotlivých nitrososloučenin je však povětšinou neznáma a nelze tak jejich zdravotní účinek prokázat. Zdravotní nezávadnost piv se doposud posuzuje sledováním koncentrací ATNC. Zastoupení látek v ATNC je velice variabilní, například stejná hodnota ATNC u piv různých výrobců neznamena totožné zastoupení jednotlivých nitrososloučenin [8].

1.4 Chemiluminiscenční detektor selektivní pro nitrososloučeniny

Chemiluminiscenční detektor se ve starší literatuře objevuje pod názvem TEA (z ang. Thermal Energy Analyzer). Čím dál častěji se však používá přesnější název NCD (z ang. Nitroso Specific Chemiluminescence Detector), nebo-li chemi-luminiscenční detektor selektivní pro nitrososloučeniny. Detektor NCD se zapojením k plynovému chromatografu se široce využívá pro komerční stanovení *N*-nitrosaminů v různých matricích [88].

Princip detekce je následující: výstup z kolony plynového chromatografu ústí do pyrolyzní pece, ve které jsou analyty termicky štěpeny za vzniku nitrosyl radikálů. Vzniklé nitrosylové radikály pokračují do evakuované reakční komory, kde reagují s ozonem za vzniku oxidu dusičitého v excitovaném stavu. Při přechodu z excitovaného stavu do základního stavu emituje charakteristické elektromagnetické záření o vlnové délce blízkého infračerveného záření (600-3000 nm). Uvolněné energetické kvantum je zachyceno citlivým fotonásobičem a intenzita vyzářené energie je přímo úměrná koncentraci analytu [89]. Schéma detekce je zobrazeno na **Obr. 1.4.1**.

Možné interference mohou způsobit fragmenty, např. ethylen nebo oxid uhličitý, které reagují s ozonem a vyzáří energetické kvantum. Tento typ interferencí je eliminován červeným optickým filtrem, který odfiltruje záření o vlnové délce menší než 600 nm [89]. Nevýhodou NCD detektoru je jeho citlivost na okolní tlak a náročnost na údržbu a servis.

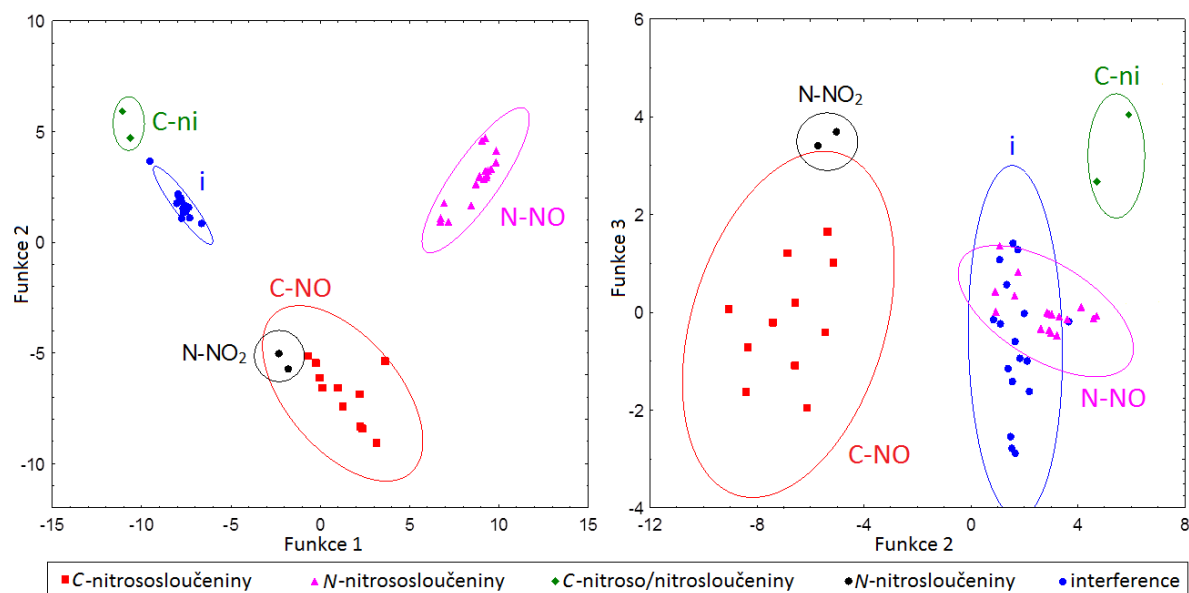


Obr. 1.4.1: Schéma principu detekce

1.4.1 Klasifikační metoda

Detektor NCD je obecně selektivní na *N*-nitrososkupiny. Při teplotách ≤ 500 °C jsou štěpeny výhradně *N*-nitrososloucheniny, jelikož vazba N-NO je energeticky chudší než vazba C-NO. Bylo však zjištěno, že jeho selektivita se mění s rostoucí pyrolyzní teplotou. Při vyšších teplotách pravděpodobně dochází ke štěpení i dalších vazeb obsahujících nitroso- nebo nitro- skupinu, například C-NO/NO₂ či N-NO₂.

Na tomto principu byla vyvinuta nová metoda, která byla poprvé použita pro klasifikaci netěkavých nitrososlouchenin v kontaminovaném pivu [11]. Metoda je založena na profilování pyrolyzních produktů netěkavých nitrososlouchenin, jež jsou zaznamenávány ve formě chromatografických píků. Bylo zjištěno, že látky stejných skupin vykazují podobné pyrolyzní profily. Byla proměřena řada standardních látek spadajících do skupin *N*-nitrososlouchenin, *C*-nitrososlouchenin, *N*-nitroslouchenin, *C*-nitroso/nitroslouchenin a interferentů při pyrolyzních teplotách 500, 600, 700, 750 a 800 °C. Výstupní data z chromatogramů pak byla následně zpracována diskriminační analýzou. Výsledná funkce vykazovala dobré klasifikační schopnosti se správností až 96,12 %. Výsledkem diskriminační analýzy jsou tři proměnné, podle kterých jsou analyty klasifikovány do rozdílných skupin, viz Obr. 1.4.2. Nejmenší správnost vykazovala klasifikace *C*-nitrososlouchenin, kvůli překryvu funkcí s *N*-nitraminy [11].



Obr. 1.4.2: Grafické zobrazení klasifikační funkce (zdroj [11])

Spojení této klasifikační metody s vyvinutou extrakční metodou sladu umožní vzniknout rychlé screeningové metodě pro orientační rozdělení netěkavých nitrososlučenin sladu do charakteristických skupin. Metoda umožňuje odlišení *N*-nitrososlučenin a *C*-nitrososlučenin od interferujících látek sladu, a tím tvoří základ pro další výzkum strukturních vlastností netěkavých nitrososlučenin.

2. Experimentální část

2.1 Chemikálie

Extrakčními činidly byly pyridin ($\geq 99,8$ %, Sigma-Aldrich), chloroform p.a. ($\geq 99,8$ %, Merck), acetoniril p.a. ($\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich), ethylacetát p.a. ($\geq 99,5$ %, Sigma-Aldrich), diethylether p.a. (99,9 %, Lach-Ner), aceton p.a. (99,97 %, Lach-Ner) a toluen p.a. (≥ 99 %, Lach-Ner). K derivatizaci analytů byla použita směs *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu a trimethylchlorsilanu (99:1, v/v, Sigma-Aldrich), hexamethyldisilazan ($\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich) a kyselina trifluorooctová ($\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich). Dále byl použit kovový zinek zrněný p.a. ($\geq 99,9$ %, Chemapol), kyselina dusičná (65%, Merck) a pevný dusitan sodný p.a. (Lach-Ner).

Jako standardní roztoky byly použity *N*-nitrosodimethylamin, *N*-nitrosodiethylamin, *N*-nitrosodiisopropylamin a *N*-nitrosodipropylamin (100 $\mu\text{g/ml}$, Ultra Scientific), ze kterých byl připraven zásobní roztok o koncentraci 200 $\mu\text{g/l}$ v hexanu. Ze standardního roztoku *N*-nitrosoprolinu (100 $\mu\text{g/ml}$, Isconlab) byl připraven zásobní roztok o koncentraci 200 $\mu\text{g/l}$ v roztoku acetonitrilu a směsi *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidu s trimethylchlorsilanem (1:1, v/v).

2.2 Seznam vzorků

Pro práci byly použity experimentální i komerční slady plzeňského, mnichovského, karamelového, pšeničného a barvicího typu i sladovnický ječmen. Seznam použitých sladů a sladovnického ječmene s uvedenými koncentracemi těkavých *N*-nitrosaminů je uveden v **Tab. P1** v kapitole **Přílohy**. Koncentrace těkavých *N*-nitrosaminů byly získány z databáze VÚPS.

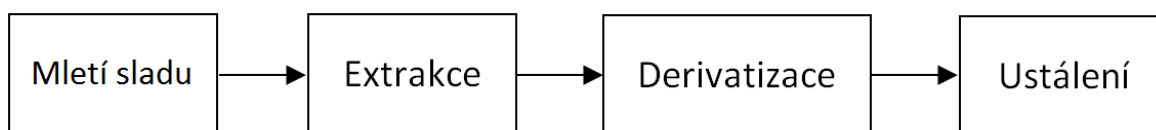
2.3 Přístrojové vybavení

Extrakce a derivatizace vzorků byla provedena na blokové lázni Pierce Reacti-Therm I #18822, Thermo Scientific, USA. Analýza vzorků byla provedena na plynovém chromatografu Trace 1310, Thermo Scientific, USA. Analyty byly separovány na kapilární koloně TG-200 MS (30 m, 0,25 mm a s tloušťkou vrstvy stacionární fáze trifluoropropylmethyl polysiloxan 0,25 μm , Thermo Scientific, USA). Mobilní fází byl argon, 99,996 % (Messer Technologies, Německo). Detekce analytů probíhala pomocí

chemiluminiscenčního detektoru TEA 820 Series, Ellutia, UK. Chromatogramy byly zpracovány s využitím softwaru Chromeleon 7.

2.4 Postup přípravy vzorků

Obecný postup přípravy vzorků je zobrazen pomocí schématu na **Obr. 2.4**. Zrna sladu byla namleta na jemnou moučku pomocí elektrického mlýnku. Pluchy sladu byly připraveny hrubým namletím sladu a následným oddělením pluch od sladové moučky pomocí pinzety. Pluchy byly nejemno namlety pomocí ručního mlýnku na koření. Zbylá sladová moučka byla nejemno namleta opět elektrickým mlýnkem. Namletý slad (příp. namleté pluchy nebo sladová moučka) byly převedeny do 0,4ml insertu s plochým dnem a jejich hmotnost činila přesně asi 50 mg. Insert byl umístěn do 2ml šroubovací vialky a ke sladu bylo přidáno 50 μ l extrakční směsi pyridinu a acetonitrilu (60:40, v/v). Vzorek byl extrahován při 65 °C po dobu 10 min a následně byl přidán hexamethyldisilazan (100 μ l) a kyselina trifluorooctová (1 μ l). První část derivatizace byla ponechána 30 min při 65 °C. Dále bylo přidáno 50 μ l směsi *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu a trimethylchlorsilanu (99:1, v/v). Druhá část derivatizace činila dalších 30 min při 65 °C. Vzorky byly pro ustálení ponechány při laboratorní teplotě (20 °C) po dobu 10 min. Extrakce, derivatizace a ustalování probíhalo vždy v uzavřené vialce bez přístupu světla. Extrakt byl z vialky odebrán pomocí mikrostříkačky, převeden do nového insertu a analyzován pomocí GC-NCD.



Obr. 2.4: Schéma přípravy vzorků k analýze

2.5 Podmínky analýzy na GC-NCD

Všechny vzorky byly analyzovány za následujících podmínek: nástřik technikou split (1:10) s objemem nástřiku 2,0 μ l a teplotou nástřiku 210 °C. Oplach septa činil 6 ml/min. Konstantní rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,6 ml/min. Teplotní program během analýzy byl: 50 °C (1 min) - 20 °C/min - 150 °C (5 min) - 10 °C/min - 210 °C (3 min) - 10 °C/min - 320 °C (6 min). Na výstupu kolony činila teplota rozhraní 250 °C. Pyrolyzní pec byla standardně vyhřívána na 750 °C. Průtok kyslíku do detektoru činil

3,2 ml/min. Teplota v reakční komůrce činila $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ s tlakem 93,3 Pa. Celková doba analýzy byla 37,5 min.

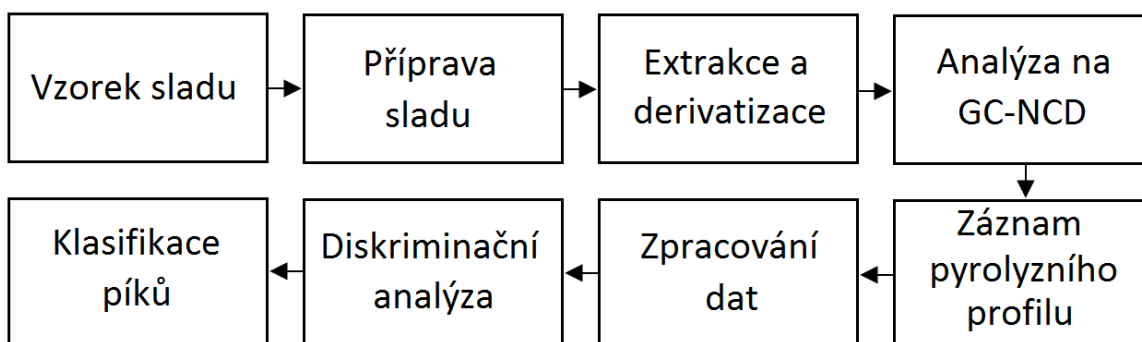
2.6 Zpracování dat

Pro statistické zpracování výsledků byly výchozími daty plochy nebo výšky chromatografických píků. Návrhy experimentálních designů jsou uvedeny v **Tab. P2-P4** v kapitole **Přílohy**. Experimentální designy byly vyhodnoceny metodou analýzy rozptylu strategií zpětné eliminace na hladině pravděpodobnosti 95 %.

Pro účely hodnocení kvality proložení dat matematickou funkcí byly použity diagnostické grafy reziduí. Pro vyhodnocení dat byla dále použita analýza hlavních komponent a pro sestavení teplotní mapy byla použita Euklidovská vzdálenost s Wardovou metodou shlukování. Během aplikace screeningové metody na reálné vzorky byly před diskriminační analýzou odebrány plochy píků, které byly pod limitem detekce.

2.7 Postup kompletní screeningové metody

Na **Obr. 2.7** je zobrazeno schéma spojené extrakční a klasifikační metody dávající kompletní screeningovou metodu pro stanovení nitrososloučenin ve sladu. Po přípravě vzorků dle vyvinuté extrakční metody byl pyrolyzní profil zaznamenán pro teploty 500, 650, 700, 750 a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výchozí data, kterými byly plochy nebo výšky píků, byla vyhodnocena pomocí diskriminační analýzy v softwaru Statistica.



Obr. 2.7: Obecné schéma screeningové metody

2.8 Příprava vzorků s vyšším množstvím nitrososloučenin

2.8.1 Příprava extraktu sladu nitrovaného roztokem dusitanů

Do 20ml krympovací vialky bylo naváženo 400,2 mg namletých pluch sladu MN1

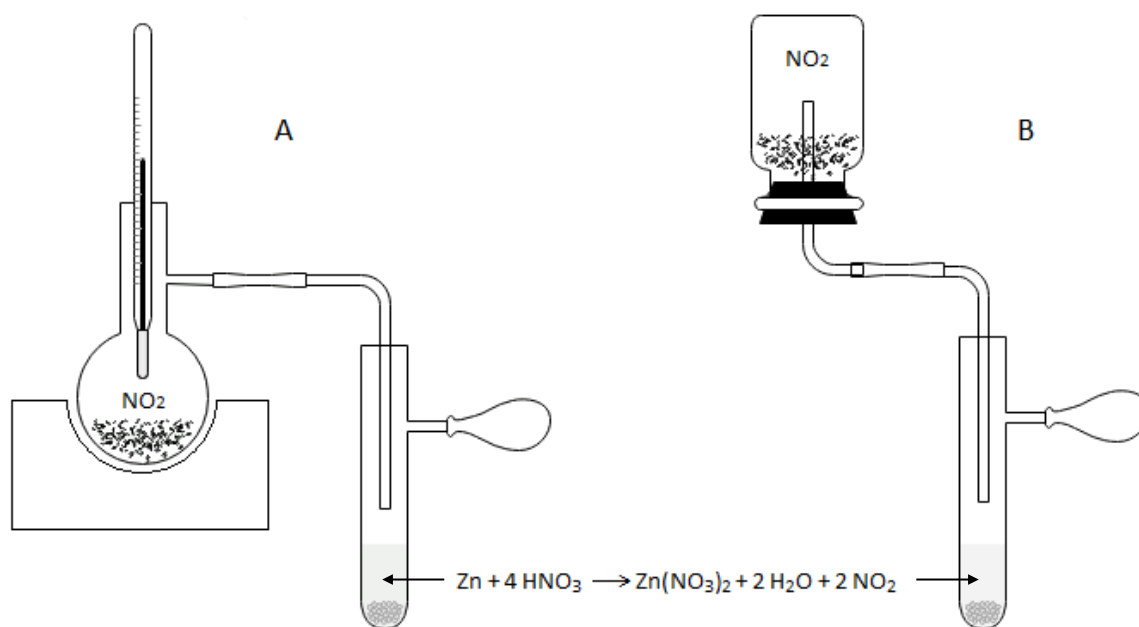
a bylo přidáno 10 ml extrakční směsi pyridinu a acetonitrilu (60:40, v/v). Extrakce probíhala v uzavřené vialce a bez přístupu světla po dobu 60 min při 65 °C a ustalování probíhalo 30 min při 20 °C. Pomocí nedělené pipety byly do dvou 50ml srdcových baněk převedeny 2,0 ml extraktu. Extrakty byly odpařeny na vakuové rotační odparce za podmínek 27 mBar a 40 °C. Dále byl připraven vodný roztok dusitanu sodného o koncentraci 9,5 mg/ml. Odparek byl rozpuštěn ve 3 ml destilované vody a pouze do jedné baňky bylo přidáno 50,0 µl roztoku dusitanu sodného. Baňky byly ponechány v temnu při 20 °C po dobu 90 min. Obsah baněk byl odpařen na vakuové rotační odparce za podmínek 27 mBar a 40 °C. Odparky byly rozpuštěny v 200 µl extrakční směsi pyridinu a acetonitrilu (60:40, v/v) a převedeny do 0,5 ml insertu s plochým dnem umístěném v 2ml šroubovací vialce. Do insertu bylo přidáno 200 µl směsi *N,O*-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidu s 1% trimethylchlorsilanem. Vzorky byly ponechány derivatizovat po dobu 30 min při 65 °C a ustalovány po dobu 30 min při 20 °C v uzavřených vialkách v temnu. Následně byla provedena analýza na GC-NCD.

2.8.2 Příprava sladu nitrovaného plynným oxidem dusičitým

Aparatura pro nitrosaci sladu plynným oxidem dusičitým za horka je zobrazena na **Obr. 2.8 A**. V reakční baňce s kulatým dnem bylo 46 g celého sladu PL3 navlhčeno 10 ml destilované vody. Baňka generující oxid dusičitý byla naplněna 50 ml koncentrované kyseliny dusičné, ke které byl postupně přidáván kovový zinek. Vznikající oxid dusičitý ústl do reakční baňky se sladem. Reakční baňka byla uzavřena a mírně zahřívána na topném hnízdě po dobu 2 h v atmosféře oxidu dusičitého (teplota nad sladem činila 36-40 °C). Slad byl následně usušen při 83 °C po dobu 2 h. Stejným postupem byl připraven nenitrovaný slad PL3, který byl zahříván bez přídavku oxidu dusičitého. Čas zahřívání činil 60 min, z důvodu vysokých teplot v reakční baňce ze vznikající vodní páry. Doba sušení činila 1,5 h. Oba slady byly pro GC analýzu připraveny standardním způsobem.

Aparatura pro nitrosaci sladu plynným oxidem dusičitým za studena je zobrazena na **Obr. 2.8 B**. Do baňky se zábrusem bylo převedeno 20 g celého sladu PL3. Ke sladu byly přidány 4 ml destilované vody a navlhčený slad byl ponechán 40 min v dusíkové atmosféře. Slad byl rozdělen do dvou baněk se zábrusy. Přibližně polovina navlhčeného sladu byla ponechána v uzavřené baňce v atmosféře dusíku v temnu do druhého dne.

Druhá baňka byla naplněna oxidem dusičitým, který byl připraven následovně: baňka generující oxid dusičitý byla naplněna 10 ml koncentrované kyseliny dusičné, ke které byl postupně přidáván kovový zinek. Vznikající oxid dusičitý ústil do baňky se sladem, která byla následně uzavřena a ponechána do druhého dne v temnu. Oba slady byly druhý den usušeny při 40 °C po dobu 2 h a pro analýzu na plynové chromatografii připraveny standardním způsobem.



Obr. 2.8: Aparatura pro nitrosaci sladu za horka (A) a za studena (B)

3. Výsledky a diskuze

Prvotním cílem této diplomové práce bylo optimalizovat vhodný extrakční a derivatizační postup pro stanovení netěkavých nitrososloučenin ve sladu pomocí GC-NCD. Toho bylo dosaženo za použití metod experimentálního designu a vícerozměrných statistických metod. V průběhu vývoje extrakční metody byla na vybraných vzorcích testována klasifikační metoda podle literatury [11]. Jelikož jsou koncentrace hledaných analytů v řádu ppb, bylo žádoucí připravit slad se zvýšeným množstvím nitrososloučenin. Další část práce byla proto věnována přípravě a charakterizaci vzorků sladu, které byly v přímém kontaktu s nitrosačním činidlem. Nakonec byla vyvinutá extrakční metoda spojena s klasifikační metodou a aplikována na reálné vzorky.

3.1 Vývoj extrakční metody

Hlavním cílem extrakční metody bylo převést pokud možno maximum analytů, konkrétně nitrososloučenin, ze sladu do roztoku. Podmínkou při tom bylo zachovat metodu po celou dobu vývoje v miniaturizovaném měřítku, aby byl dodržován konstantní objem extrakčních a derivatizačních činidel, který dohromady činil 200 μ l. Tento objem byl zvolen experimentálně v rámci prvotního experimentu, kdy byla testována extraktivnost hledaných analytů z pluch sladu. Větší objem přidaných činidel by způsobil úbytek analytů v extraktu z důvodu jejich naředění.

V rámci vývoje analytické metody byly dodržovány základní postupy, které v prvním kroku zahrnují screeningové metody pro vymezení vhodných extrakčních činidel. V další fázi bylo složení extrakční směsi optimalizováno a byl studován vliv ultrazvuku na extrakci. Dále bylo zkoumáno, z jakých částí sladových zrn se extrahuje nejvíce hledaných analytů. Porovnány byly extrakty připravené z pluch sladu, sladové moučky a z celých zrn sladu.

Z důvodu nízké těkavosti hledaných analytů bylo nutné extrahované analyty před analýzou na GC derivatizovat. Jako extrakční činidla byla použita pouze aprotická rozpouštědla, která se neúčastní derivatizační reakce a derivatizace analytů tak probíhá kvantitativně. Původním derivatizačním činidlem byla pouze směs *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu s trimethylchlorsilanem (99:1, v/v, dále jen BSTFA). Derivatizační postup byl v rámci vývoje rozšířen použitím hexamethyldisilazanu

(dále HMDS) jako druhého derivatizačního činidla.

Výsledná metoda by měla být rychlá, a proto byl celý extrakční a derivatizační postup optimalizován, aby bylo dosaženo požadovaného zkrácení času přípravy. Pro kontrolu správnosti klasifikační metody byly analyzovány vzorky ječmene a k nim příslušných sladů.

3.1.1 Test extraktivnosti vybraných analytů

V prvotním experimentu byla testována extraktivnost hledaných analytů z pluch sladu mnichovského typu MN1. Pluchy byly zvoleny proto, že se v nich předpokládá největší koncentrace nitrososloučenin a jejich prekurzorů [4]. Byly připraveny celkem tři extrakty z pluch. Extrakčními činidly v prvním vzorku byl pyridin a ve druhém chloroform. Derivatizační činidlo BSTFA bylo přidáno k extrakčnímu činidlu ihned po sobě a v poměru 1:1. Ve třetím vzorku bylo derivatizační činidlo BSTFA použito i jako extrakční činidlo. Objem přidávaných činidel byl dohromady 200 μ l. Doba extrakce činila 60 min při 65 °C a doba ustalování 60 min při 20 °C. U všech vzorků byl pomocí GC-NCD zaznamenán celý pyrolyzní profil a byla aplikována diskriminační analýza, která klasifikovala chromatografické píky do skupin *N*-nitrososloučenin, *C*-nitrososloučenin, látek obsahující kombinaci *C*-nitroso/nitrososloučenin a interferencí.

Vzorek připravený extrakcí pyridinem s BSTFA obsahoval dohromady 12 píků, vzorek extrahovaný samotným BSTFA obsahoval celkem 10 píků a vzorek extrahovaný chloroformem s BSTFA obsahoval celkem 8 píků klasifikovaných jako *N*-nitrososloučeniny a *C*-nitrososloučeniny (příp. *C*-nitroso/nitrososloučeniny). Klasifikované píky skupin *N*-nitrososloučenin, *C*-nitrososloučenin a *C*-nitroso/nitrososloučenin, měly v každém vzorku rozdílné retenční časy. Do roztoku tak z pluch pravděpodobně přecházely látky rozdílné struktury, dle jejich afinity k použitému extrakčnímu činidlu. Jelikož byly zaznamenány chromatografické píky i u vzorku připraveného extrakcí pluch pomocí pouze BSTFA, lze usoudit, že k extrakci neznámých analytů do roztoku přispívá i samotné derivatizační činidlo.

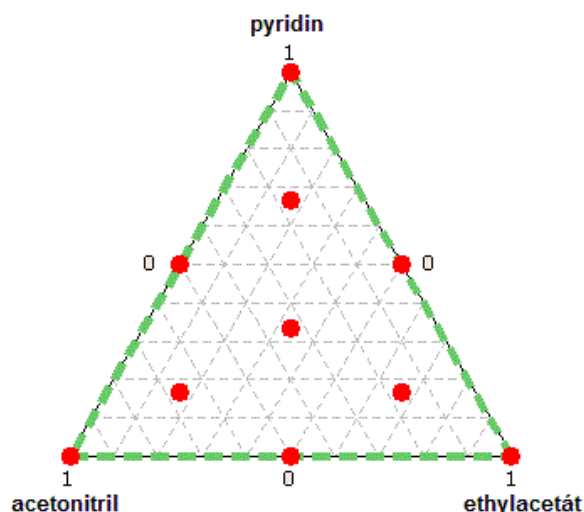
Ve výsledku však nelze odlišit, zda daná látka do roztoku přechází díky extrakčnímu činidlu, či díky BSTFA nebo kombinaci těchto dvou látek. V dalším kroku bylo zapotřebí pomocí jednoduchého screeningu vybrat taková extrakční činidla, do kterých v kombinaci s BSTFA přechází největší spektrum analytů. Proto byly

porovnány vzorky z pluch sladu MN1, které byly připravené za použití následujících extrakčních činidel: aceton, acetonitril, chloroform, diethylether, ethylacetát a toluen. Derivatizační činidlo BSTFA bylo přidáno k extrakčnímu činidlu ve stejný čas v poměru 1:1, čas extrakce a ustalování byl stejný jako v prvotním experimentu. Všechny vzorky byly analyzovány na GC při pyrolyzní teplotě 750 °C.

Extrakční účinek jednotlivých rozpouštědel byl posuzován podle počtu chromatografických píků a podle jejich výšky. Nejlepšími extrakčními činidly byly acetonitril a pyridin, tedy rozpouštědla obsahující ve své struktuře bazický dusík. Další nejlepší extrakční účinnost měl ethylacetát. Tato rozpouštědla mají středně polární charakter [90]. Z toho lze předpokládat, že skupinu netěkavých nitrososloučenin pravděpodobně tvoří látky podobné struktury a podobné polarity.

3.1.2 Složení směsi extrakčního činidla

Na základě předchozího experimentu byla vybrána tři rozpouštědla: pyridin, acetonitril a ethylacetát, která v kombinaci s BSTFA měla nejlepší extrakční účinnost v rámci testovaných rozpouštědel. Extrakční vlastnosti čistých rozpouštědel jsou však odlišná od extrakčních vlastností směsí dvou a více rozpouštědel. K nalezení vhodné kombinace těchto tří rozpouštědel, které by v kombinaci s BSTFA extrahovaly z pluch nejvíce analytů, byl využit tzv. směsový design (z ang. mixture design) [91] s objemem extrakční směsi 100 µl. Derivatizační činidlo BSTFA (100 µl) bylo přidáno k extrakčnímu činidlu ve stejnou dobu, čas extrakce a ustalování byl stejný jako v prvotním experimentu. Návrh směsového designu pro tři rozpouštědla je zobrazen na **Obr. 3.1.1**, kde jsou červeným bodem označeny provedené experimenty. Jedničky ve vrcholech trojúhelníku označují čisté rozpouštědlo a ostatní body v prostoru trojúhelníku označují směs o konkrétním poměrném zastoupení rozpouštědel. Nuly na spojnici mezi dvěma rozpouštědly označují nulové zastoupení třetího rozpouštědla, které se nachází v protilehlém vrcholu od této spojnice. Vzorky byly připravovány i analyzovány na GC-NCD podle **Tab. P2** v kapitole **Přílohy**.



Obr. 3.1.1: Směsový design pro tři rozpouštědla, kde červené body označují experiment o konkrétním poměrném zastoupení jednotlivých rozpouštědel ve směsi

Pro vyhodnocení byly použity plochy chromatografických píků. Z důvodu rozdílných velikostí ploch byly píky eluující v retenčním čase 4-16 min (**Blok 1**) vyhodnoceny zvlášť od píků eluující v čase 23-27 min (**Blok 2**). Suma ploch píků v rámci každého bloku byla použita pro vyhodnocení matematického modelu, který má obecný tvar:

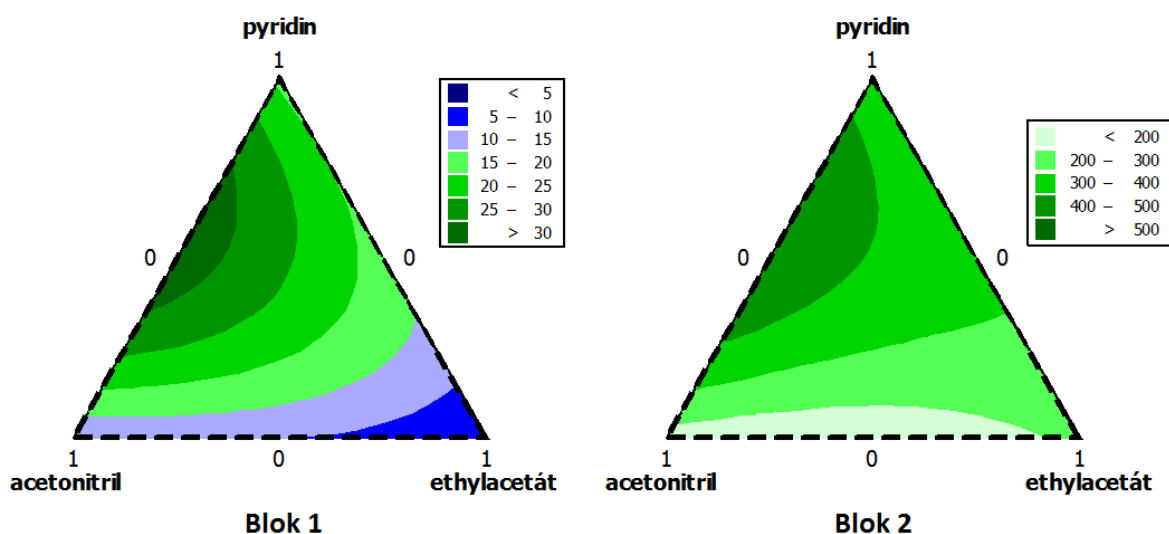
$$y = \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

kde y je velikost odezvy (suma ploch píků v daném bloku), β_i je regresní koeficient daného faktoru x_i (objemové procento daného rozpouštědla) a β_{ij} je regresní koeficient interakce mezi faktory x_i a x_j [92]. Vyhodnocené regresní koeficienty se standardní chybou a koeficientem determinace jsou vyneseny v **Tab. 3.1.1**. Na základě rovnice (1) s dosazenými regresními koeficienty z **Tab. 3.1.1** byly vykresleny konturové grafy **Bloku 1** a **Bloku 2** (viz **Obr. 3.1.2**). Zbarvení vrstevnic odpovídá intenzitě odezvy v každém bodě prostoru. V konturovém grafu prvního bloku značí tmavě zelená barva oblast optimálních směsí s vysokou odezvou a naopak tmavě modrá barva značí oblasti s nízkou odezvou. Ve druhém bloku se vysoké odezvové plochy (tmavě zelená barva) nachází ve stejné oblasti jako v prvním bloku. Pomocí matematického modelu a regresních koeficientů byla jako optimální určena směs pyridin: acetonitril: ethylacetát v poměru (60:40:0, v/v/v).

Tab. 3.1.1: Regresní koeficienty se standardní chybou vypočítané dle rovnice (1) směsového designu tří rozpouštědel, včetně koeficientu determinace

	Blok 1		Blok 2	
R² [%]	81,04		76,20	
Faktory¹	Regresní koeficient	Standardní chyba	Regresní koeficient	Standardní chyba
pyridin	18,66	5,86	321,40	89,42
acetonitril	10,11	5,86	157,00	89,42
ethylacetát	4,91	5,86	223,70	89,42
pyridin×acetonitril	73,66	27,00	1024,60	412,14
pyridin×ethylacetát	24,19	27,00	184,20	412,14
acetonitril×ethylacetát	10,90	27,00	-255,10	412,14

¹ Faktorem je objemové procento jednotlivých rozpouštědel pyridinu, acetonitrilu, ethylacetátu



Obr. 3.1.2: Konturový graf směsového designu tří rozpouštědel pro Blok 1 a Blok 2

Směsi rozpouštědel mohou mít oproti čistým rozpouštědlům vyšší extrakční účinnost, což nastalo v případě pyridinu a acetonitrilu. Může však nastat i opačný jev, kdy je ve směsi extrakční účinnost daného rozpouštědla snížena. Dle zakřivení vrstevnice v **Bloku 2** pak tento jev pravděpodobně nastal v případě směsi ethylacetátu s acetonitrilem. I když byla pomocí směsového designu pro tři rozpouštědla vyhodnocena optimální směs pyridin a acetonitril, bylo v dalším zájmu ověřit opačné vlastnosti ethylacetátu. V dalším experimentu bylo opět za pomoci směsového designu testováno širší spektrum rozpouštědel: aceton, acetonitril, chloroform, ethylacetát a pyridin. Tímto experimentem

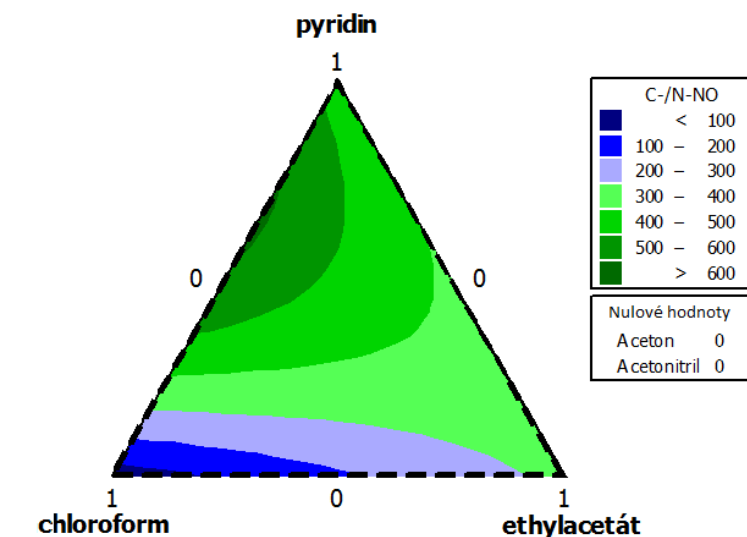
měly být zkoumány interakce ethylacetátu s dalšími rozpouštědly a zároveň mohla být navržena jiná optimální směs, případně potvrzena dosavadní optimální směs pyridin: acetonitril (60:40, v/v).

Vzorky směsového designu pro pět rozpouštědel byly připravovány a analyzovány v náhodném v pořadí podle **Tab. P3** v kapitole **Přílohy**. Chromatografické píky byly porovnány s klasifikovanými píky skupin *N*-nitrososloučenin a *C*-nitrososloučenin z prvotního experimentu na základě shodných retenčních časů. Plochy pouze klasifikovaných píků *N*-nitrososloučenin a *C*-nitrososloučenin skupin byly sečteny a použity pro vyhodnocení matematického modelu daného designu podle rovnice (1). Vyhodnocené regresní koeficienty se standardní chybou a koeficientem determinace jsou vyneseny v **Tab. 3.1.2**. Na základě rovnice (1) s dosazenými regresními koeficienty z **Tab. 3.1.2** byl vykreslen konturový graf na **Obr. 3.1.3**. V případě pěti rozpouštědel není možné grafické zobrazení pro všechna rozpouštědla, z toho důvodu byly aceton a acetonitril dle optimálních parametrů zvoleny za nulové. Zbarvení vrstevnic v konturovém grafu je totožné s předchozím experimentem. Optimální objemový poměr pyridin: chloroform: acetonitril: ethylacetát: aceton byl vyhodnocen jako 65:35:0:0:0 (v/v/v/v/v).

Tab. 3.1.2 Regresní koeficienty se standardní chybou vypočítané dle rovnice (1) směsového designu pěti rozpouštědel, včetně koeficientu determinace

R^2 [%]		89,46
Faktory ¹	Regresní koeficient	Standardní chyba
aceton	191,00	51,51
acetonitril	283,00	56,00
chloroform	42,00	56,00
pyridin	448,00	56,00
ethylacetát	322,00	56,00
acetonitril×ethylacetát	-2690,00	821,87
chloroform×pyridin	1344,00	821,87

¹Faktorem je objemové procento jednotlivých rozpouštědel acetonu, acetonitrilu, chloroformu, pyridinu a ethylacetátu



Obr. 3.1.3 Konturový graf směsového designu pěti rozpouštědel

Prvním směsovým designem byla jako optimální vyhodnocena směs pyridinu a acetonitrilu v poměru 60:40 (v/v) a druhým směsovým designem směs pyridinu a chloroformu v poměru 65:35 (v/v). V obou případech se jedná o směs, ve které je pyridin v nadbytku. Mimo extrakční činidlo se pyridin používá i jako katalyzátor derivatizačních reakcí a proto pravděpodobně vytváří příznivé prostředí pro kvantitativní derivatizaci analytů. Neshoda v druhém rozpouštědle směsi s pyridinem (tj. acetonitril a chloroform) je pravděpodobně způsobena rozdílným směsovým designem experimentů. V případě směsového designu tří rozpouštědel byly experimenty na dané ploše pravidelně rozprostřeny tak, že danou plochu popisovaly s vyšší přesností. V případě směsového designu pěti rozpouštědel byly vzdálenosti mezi jednotlivými experimenty větší, z důvodu větší designové plochy. Navíc experimenty směsového designu byly navrženy tak, že vždy obsahovaly všech pět rozpouštědel o různém poměru, případně obsahovaly jen čisté rozpouštědlo. Ve směsi pěti různých rozpouštědel se pak extrakční účinnost směsi pyridinu a acetonitrilu neprojevila, jelikož mohla být jiným rozpouštědlem potlačena.

Doposud byly vzorky extrahovány dle postupu prvotního experimentu, tj. že derivatizační činidlo bylo přidáváno ve stejném čase s extrakčním činidlem a doba extrakce činila 60 min (65 °C) a doba ustalování 60 min (20 °C). V tomto experimentu bylo zkoumáno, zda BSTFA přidané k extrakční směsi v různý čas ovlivňuje extraktivnost analytů do roztoku. V rámci experimentu bylo derivatizační činidlo přidáváno v různém čase (0, 30 a 60 min) po přidavku extrakčního činidla k pluchám sladu. Čas

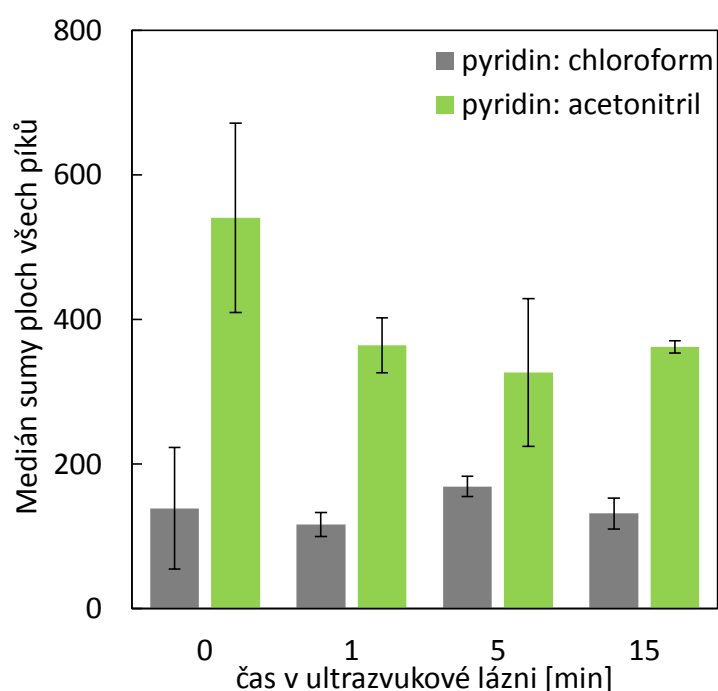
extrakce při 65 °C a čas ustalování při 20 °C však zůstal zachován. Vzorky byly analyzovány pomocí GC-NCD při pyrolyzní teplotě 750 °C.

V získaných chromatogramech bylo integrováno celkem 63 píků, jejichž plochy byly seřazeny dle retenčních časů a zároveň dle času přidání BSTFA. Plochy píků o stejném retenčním čase byly mezi sebou standardizovány. Vzorky lišící se časem přidavku BSTFA byly vyhodnocovány na základě porovnání počtu píků v daném chromatogramu s největší relativní plochou. První vzorek, ve kterém byl přídavek derivatizačního činidla aplikován v čase 0, obsahoval celkem 13 píků s nejvyšší relativní plochou. Druhý vzorek, ve kterém bylo BSTFA přidáno až po 30 min extrakce, obsahoval celkem 42 relativně největších píků a třetí vzorek, do kterého bylo BSTFA přidáno až po 60 min extrakce, bylo pouze 8 píků s relativně nejvyšší plochou. Na základě porovnání počtu relativně největších píků prvního a druhého vzorku lze usoudit, že derivatizační činidlo přispívá k extrakci analytů více, je-li přidáno až po 30 min extrakce. Ve třetím vzorku bylo BSTFA přidáno až na konci extrakce a derivatizace probíhala pouze za laboratorní teploty. Derivatizační reakce pak za nižších teplot neprobíhala kvantitativně a ve vzorku tak zůstal pravděpodobně velký podíl nezderivatizovaných analytů, které pak nemohly být detekovatelné pomocí GC-NCD. Příprava druhého vzorku, který obsahoval největší počet chromatografických píků s relativně největší plochou (tj. 42 z celkem 63 píků), byla považována za nejvhodnější pro další experimenty. Tento experiment však sloužil jako rychlý orientační test a čas extrakce, derivatizace a ustálení byl kompletně optimalizován později.

Dalším testovaným faktorem byl vliv ultrazvuku na extrahovatelnost nitrososloučenin z pluch sladu. Zároveň byly testovány obě vyhodnocené optimální směsi pyridin:acetonitril a pyridin:chloroform pro zjištění, která extrakční směs extrahuje více analytů. Vzorky sladových pluch se 100 µl extrakční směsi byly umístěny do ultrazvukové lázně po dobu 0, 1, 5 a 15 min. Vzorky byly následně extrahovány a derivatizovány novým postupem z předchozího orientačního testu, tj. BSTFA bylo přidáno po 30 min extrakce při 65 °C. Způsob přípravy a analýzy vzorků jinak zůstal zachován. Pro každý vzorek bylo provedeno celkem 6 opakování.

Výchozími daty byly sumy ploch všech píků v chromatogramu daného vzorku, které byly vyhodnoceny dvoufaktorovou analýzou rozptylu. Prvním faktorem byla doba ošetření vzorků v ultrazvukové lázni a druhým faktorem byla použitá extrakční směs.

Dle výsledků analýzy rozptylu byl vliv ultrazvuku i vliv extrakční směsi statisticky významný na hladině pravděpodobnosti 95 %, kde hodnota $p < 0,05$. Sloupkový graf na **Obr. 3.1.4** zobrazuje vliv obou faktorů. Výšky jednotlivých sloupců určují velikost mediánů ze součtů ploch chromatografických píků. Jednotlivé mediány extrakční směsi pyridin: acetonitril se s rostoucím časem v ultrazvuku snižují. Ultrazvuk pravděpodobně degraduje extrahované analyty v roztoku, což se projevuje na snižující se velikosti ploch píků. Na vzorky připravené v extrakční směsi pyridin: chloroform neměl ultrazvuk na extraktivnost analytů do roztoku vliv. Výrazně vyšší medián sumy ploch píků u všech vzorků směsi pyridin: acetonitril ukazuje, že směs pyridin: acetonitril má lepší extrakční účinnost než směs pyridin: chloroform, a proto byla tato směs zvolena jako optimální pro následující experimenty.



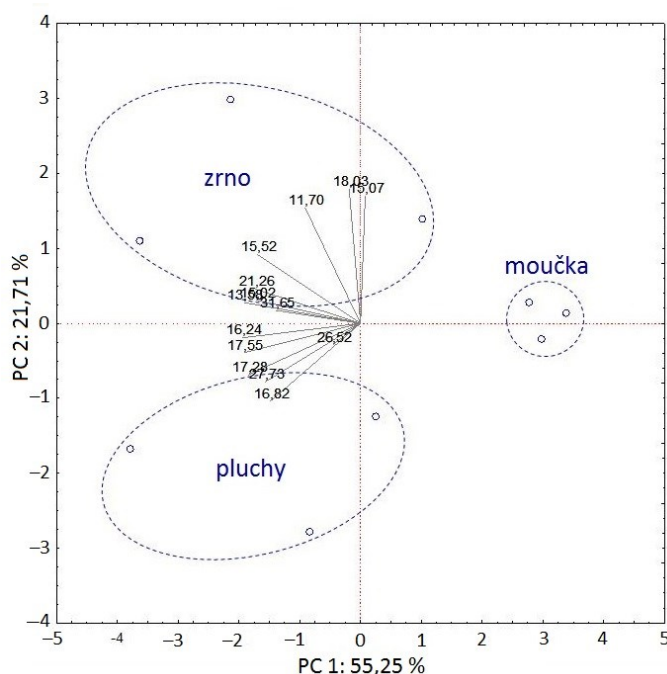
Obr. 3.1.4: Sloupkový graf vlivu ultrazvuku a extrakční směsi na medián sumy ploch všech píků chromatogramu dvoufaktorové analýzy rozptylu

3.1.3 Volba úpravy vzorků před extrakcí

Pro ověření předpokladu z literatury [4], že nejvíce nitrososloučenin a jejich možných prekurzorů je koncentrováno v pluchách, byly připraveny extrakty z namletých sladových pluch, sladové moučky a celých sladových zrn. K experimentu byly použity dva slady plzeňského typu a jeden mnichovského typu. Cílem bylo zjistit vlastnosti extraktů

podle toho, z jakých částí zrn byly extrakty připraveny. Pro vyhodnocení byla použita analýza hlavních komponent. Výchozími daty byly plochy chromatografických píků, které v daném retenčním čase eluovaly ve všech vzorcích. Na **Obr. 3.1.5** je výsledný graf analýzy hlavních komponent. Modré body odpovídají jednotlivým vzorkům, které se rozdělily do shluků podle použité části sladových zrn. Komponentní váhy reprezentují jednotlivé píky s uvedenými retenčními časy.

Výsledkem analýzy hlavní komponent jsou vytvořené shluky vzorků, které se liší podle toho, z jaké části sladu vzorky byly připravené. Ve směru osy latentní proměnné popisující největší variabilitu původních dat je významné rozdělení shluku moučky od shluků sladového zrna a pluch. Rozptyl mezi shluky zrna a pluch již tak veliký není. A jelikož separace pluch od zbytku zrna je časově náročným krokem, bylo na základě výše zmíněných výsledků od přípravy vzorků z pluch sladu odstoupeno, čímž byla výrazně zkrácena doba přípravy vzorků. Pro následující analýzy byly vzorky připravovány z namletých celých zrn sladu.

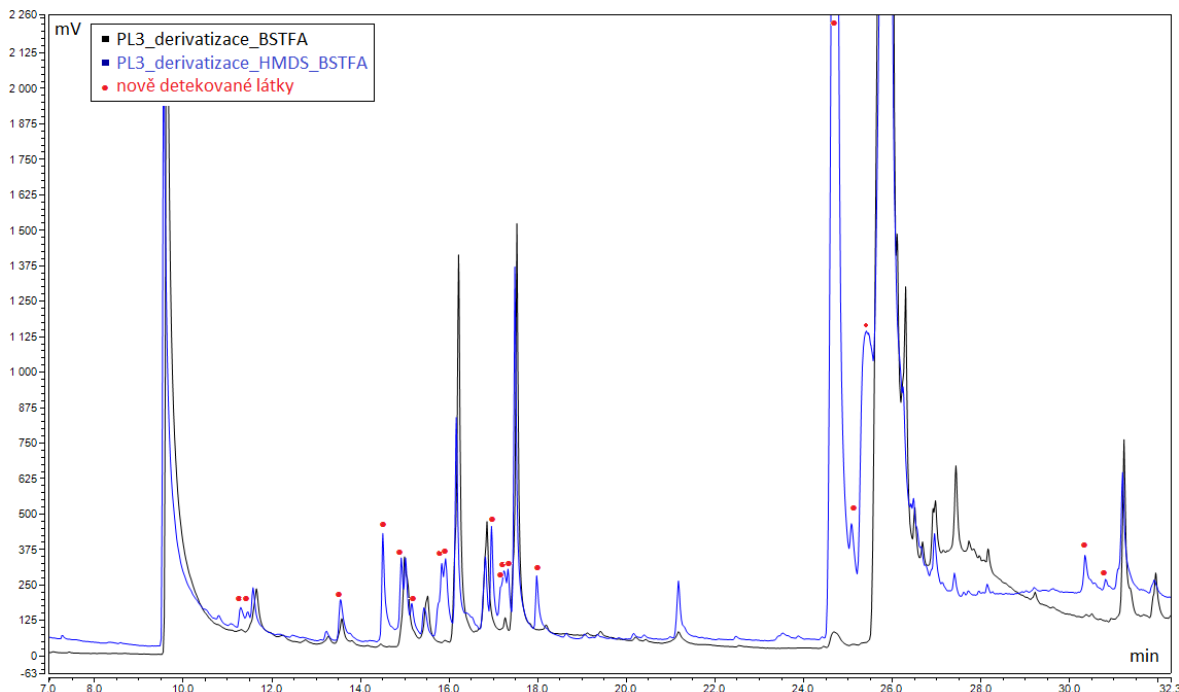


Obr. 3.1.5: Analýza hlavních komponent vzorků z pluch, zrna a moučky. Popisky komponentních vah značí retenční časy jednotlivých píků

3.1.4 Optimalizace derivatizace

Derivatizační činidlo BSTFA je silným silylačním činidlem, které je účinné na širokou škálu sloučenin včetně netěkavých *N*-nitrosaminů [74]. Nevýhodou jednokrokové silylace pomocí BSTFA je fakt, že způsobuje štěpení sacharidových

jednotek [93]. Jelikož by se ve sladu mohly nacházet i nitroso deriváty sacharidů, bylo v zájmu derivatizační postup modifikovat. Proto byl testován nový derivatizační postup, skládající se ze dvou různých silylačních činidel. Tato dvoukroková derivatizace byla provedena podle literatury, kde pomocí modifikovaného derivatizačního postupu byly stanoveny glykosidové deriváty flavonolů [94]. Nový postup zahrnuje slabší silylační činidlo HMDS, které se užívá na derivatizaci sacharidů, protože dané sacharidy neštěpí [95]. Pro testování nového derivatizačního postupu byla použita optimalizovaná směs pyridin:acetonitril. Poměr extrakčního a derivatizačního činidla byl od původního postupu upravena na poměr extrakční činidlo: HMDS: BSTFA (50:100:50, v/v/v). Doba extrakce, první derivatizace a druhé derivatizace činila vždy 30 min při 65 °C. Pro zachování celkového času přípravy extraktů z pluch (tj. 2 h) byl čas ustalování zkrácen na 30 min při 20 °C. Na **Obr. 3.1.6** je chromatogram srovnávající vzorky, připravované původním postupem derivatizace (černá linie) a novým postupem derivatizace (modrá linie). Červeně jsou označeny píky analytů, které byly po aplikaci dvoukrokové derivatizační metody nově detekovány. Novým derivatizačním postupem byla detekována řada nových analytů o neznámé struktuře, a proto byla tato dvoukroková derivatizace používána pro další experimenty.



Obr. 3.1.6: Srovnání vzorků PL3 s původním jedнокrokovým derivatizačním postupem a s novým dvoukrokovým derivatizačním postupem. Vzorky byly analyzovány na GC-NCD za totožných podmínek v kapitole 2.5, při pyrolyzní teplotě 750 °C

V této fázi již byla známa optimalizovaná extrakční i derivatizační směs, ale celkový čas extrakce, derivatizace a ustalování činil 120 min. Cílem optimalizace bylo tento čas zkrátit. Následující experiment kladl za úkol zjistit významné faktory, které ovlivňují extrakční postup. Pro odhalení významnosti faktorů byl zvolen Plackettův-Burmanův design. Zkoumanými faktory byly čas extrakce, čas obou derivatizačních kroků a čas ustálení. Vzorky byly připravovány a analyzovány v pořadí podle **Tab. P4** v kapitole **Přílohy**. Suma standardizovaných ploch byla použita pro vyhodnocení matematického modelu dle rovnice (2), která byla ve tvaru [92]:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i \quad (2)$$

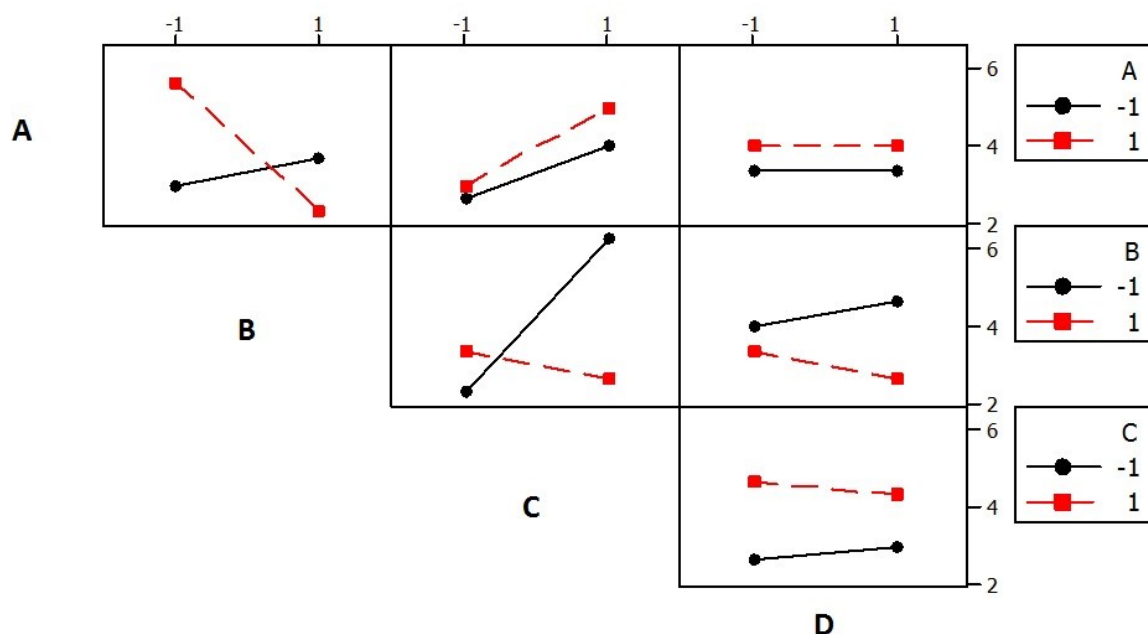
kde y je velikost odezvy (plocha píku), β_0 je hodnota regresního koeficientu daného systému bez vlivu faktoru (úsek na ose y , první řádek **Tab. 3.1.3**) a β_i je regresní koeficient daného faktoru x_i . Vyhodnocené regresní koeficienty se standardní chybou jsou vyneseny v **Tab. 3.1.3**. Z nulové hodnoty regresního koeficientu faktoru D (čas ustálení) plyne, že daný faktor není pro velikost odezvy významný. Faktory A-C jsou však podle vyhodnocených regresních koeficientů z **Tab. 3.1.3** významné. S rostoucí hodnotou faktorů A a C (čas extrakce a druhé derivatizace) roste i velikost odezvy. Naopak záporná hodnota regresního koeficientu B (čas první derivatizace) značí o opačném vlivu faktoru B na odezvu.

Tab. 3.1.3: Regresní koeficienty se standardní chybou vypočítané dle rovnice (2), včetně koeficientu determinace

R^2 [%]		30,82	
Faktory	Ozn.	Regresní koeficient	Standardní chyba
-	β_0	3,67	0,63
Čas extrakce	A	0,33	0,63
Čas po přidavku HMDS	B	-0,67	0,63
Čas po přidavku BSTFA	C	0,83	0,63
Čas ustalování	D	0,00	0,63

Z důvodu nízkého koeficientu determinace příslušného matematického modelu, bylo vysvětleno pouze 30,82 % z celkové variability odezvy plochy pomocí regresního modelu, a proto nelze s jistotou rozhodnout o významnosti faktorů A-C. Grafické zobrazení závislosti velikosti odezvy na kombinaci faktorů A-D je zobrazeno

na **Obr. 3.1.7**. Kombinace faktorů, které spolu interagují, jsou v grafu zobrazeny jako protínající se úsečky. V pravém sloupci grafů se úsečky neprotínají, což značí nulovou interakci faktoru D s ostatními faktory. Protínající se úsečky jsou zaznamenány pouze na grafech kombinací AB a BC, z nichž lze vyhodnotit dvě možné kombinace faktorů dávající vysokou odezvu. První kombinace faktorů AB, kdy faktory A i B činí 10 min (při konstantní hodnotě C = 30 min) a druhá kombinace faktorů BC, kdy faktory B i C činí 30 min (při konstantní hodnotě A = 10 min). Byla zvolena druhá kombinace faktorů, protože bylo v zájmu extrakční metody převést co nejvíce analytů do roztoku a analyty kvantitativně derivatizovat. Budou-li oba kroky derivatizačního postupu probíhat delší dobu, dosáhne se tím spíše požadované derivatizace. Jako nejvhodnější kombinace faktorů byly zvoleny: faktor A byl zkrácen na hodnotu 10 min, faktory B a C byly ponechány 30 min a faktor D byl zkrácen na 10 min a tím bylo dosaženo požadovaného zkrácení času pro přípravu vzorků. Z původních 120 min extrakční a derivatizační fáze byl čas zkrácen na 80 min.



Obr. 3.1.7: Grafické znázornění odezvosvé plochy píků závislé na interakci faktorů A-D. Hodnoty **-1** značí nižší hladinu daného faktoru (10 min) a hodnoty **1** značí vyšší hladinu faktoru (30 min)

3.1.5 Kontrola klasifikační metody

Aby byla vyvinutá screeningová metoda kompletní a mohla být aplikována na reálné vzorky, byl proveden následující kontrolní experiment. V rámci experimentu byly připraveny extrakty čtyř druhů ječmene a k nim odpovídajících sladů. Vzorky byly připraveny vyvinutou extrakční metodou a u ječmene JE2 byl zaznamenán pyrolyzní

profil. Cílem bylo ověřit, že látky, klasifikované jako *N*-nitrososloučeniny, *C*-nitrososloučeniny a *C*-nitroso/nitrososloučeniny nebudou přítomny v extraktech ječmene, čímž by se potvrdila správnost klasifikační metody.

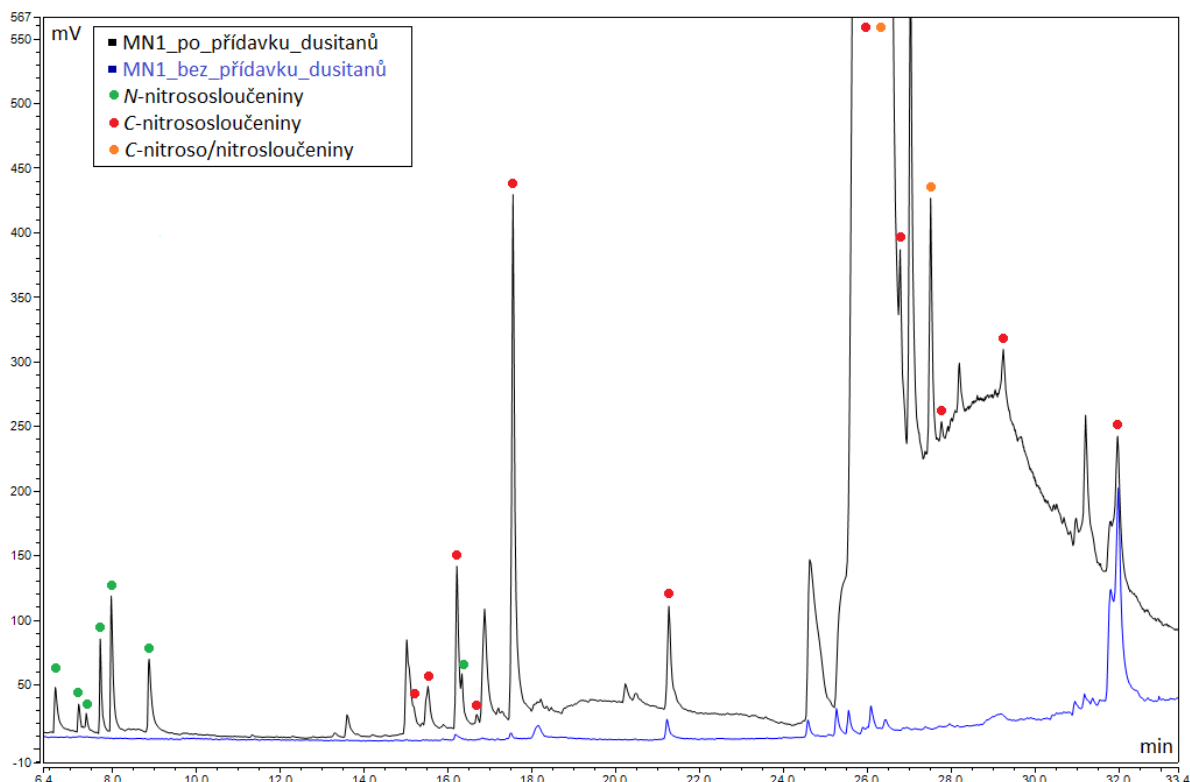
V chromatogramu ječmene nebyly žádné píky klasifikovány jako *N*-nitrososloučeniny a pouze jeden pík jako *C*-nitrososloučenina. Vzhledem ke koeluci tohoto píku s vedlejším píkem, mohlo by se v tomto případě jednat o chybnou klasifikaci. Předpokládá se, že nitrososloučeniny by se obecně v ječmeni neměly vyskytovat. Avšak vzhledem k nízkému počtu prací zabývajících se *C*-nitrososloučeninami ve sladu a v ječmeni, nelze vyloučit, že by se některé *C*-nitrososloučeniny mohly v ječmeni objevit. Obecně však výsledky byly v souladu s předpokladem, že *C*-nitrososloučeniny i *N*-nitrososloučeniny vznikají během sladování [26].

3.2 Nitrosace sladu

Následující experimenty měly za cíl připravit vzorky extraktů sladů, příp. pluch s vyšším podílem nitrososloučenin. Vyššího podílu nitrososloučenin bylo dosaženo působením nitrosačního činidla na prekurzory nitrososloučenin sladu. Během vývoje extrakční metody byly na slad aplikovány celkem tři různé nitrosační metody. První metoda spočívala v nitrosaci extraktu sladu ve vodném prostředí pomocí dusitanových iontů. Další dvě metody byly založeny na nitrosaci namočeného sladu pomocí plynného oxidu dusičitého.

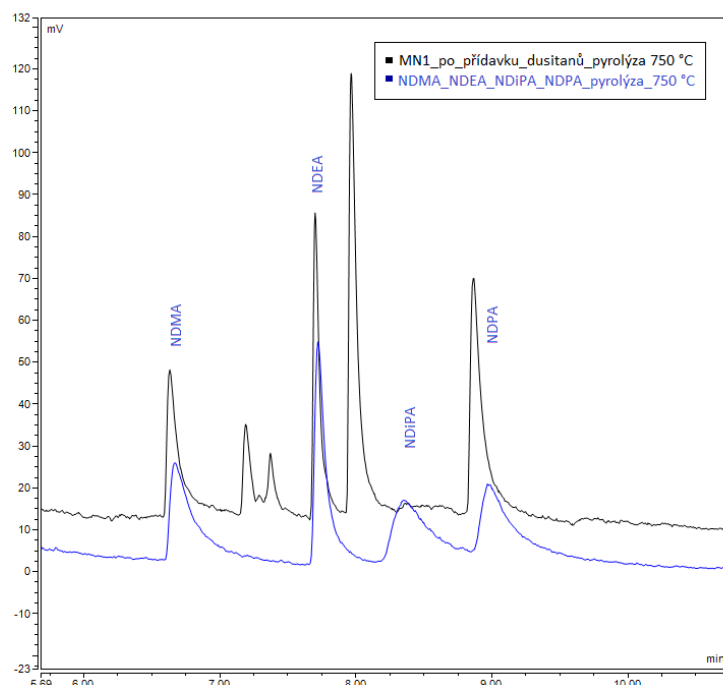
3.2.1 Nitrosace extraktů sladu v roztoku dusitanů

Vzorky připravené nitrosací extraktů z pluch sladu roztokem dusitanů byly analyzovány pomocí GC-NCD a byl zaznamenán celý pyrolyzní profil nitrosováných vzorků. Postup přípravy vzorků byl popsán v kapitole 2.8. Chromatogramy extraktů pluch sladu MN1 jsou zobrazeny na **Obr. 3.2.1**. Píky analytů z nitrosovaneého extraktu pluch (černá linie) mnohonásobně zvětšily svoji velikost oproti píkům v nenitrosovaneém extraktu (modrá linie). Ve většině případů došlo pravděpodobně ke vzniku nových látek. Nelze též vyloučit, že byly tyto analyty přítomny v nenitrosovaneém extraktu, avšak v koncentracích pod limitem detekce. Po aplikaci klasifikační funkce byla většina nových píků nitrosovaneého sladu klasifikována jako látky skupin *N*-nitrososloučeniny, *C*-nitrososloučeniny a *C*-nitroso/nitrososloučeniny.



Obr. 3.2.1: Chromatogram extraktu nitrosováných a nenitrosováných pluch dusitanovými ionty. Vzorky byly analyzovány na GC-NCD za totožných podmínek v kapitole 2.5, při pyrolyzní teplotě 750 °C.

Retenční časy detekovaných N-nitrososlučenin byly porovnány se známými standardy těkavých N-nitrosaminů (NDMA, NDEA, NDiPA, NDPA). Detail chromatogramu v retenčním čase 6-10 min je zobrazen na **Obr. 3.2.2**, ve kterém je patrná shoda se standardy NDMA, NDEA a NDPA. V rámci tohoto experimentu bylo pravděpodobně připraveno několik těkavých N-nitrosaminů i řada C-nitrososlučenin. Z důvodu různého postupu přípravy nitrosováných extraktů však nelze chromatogramy porovnávat s chromatogramy vzorků, které byly připravovány vyvinutou extrakční metodou. Aby mohly být vzorky extraktů z pluch s vyšším podílem nitrososlučenin porovnatelné s nenitrosovánými vzorky pluch (příp. sladů), musel by v rámci přípravy zůstat zachován vyvinutý extrakční postup. Z toho důvodu byl nitrosován celý slad následujícími dvěma metodami.



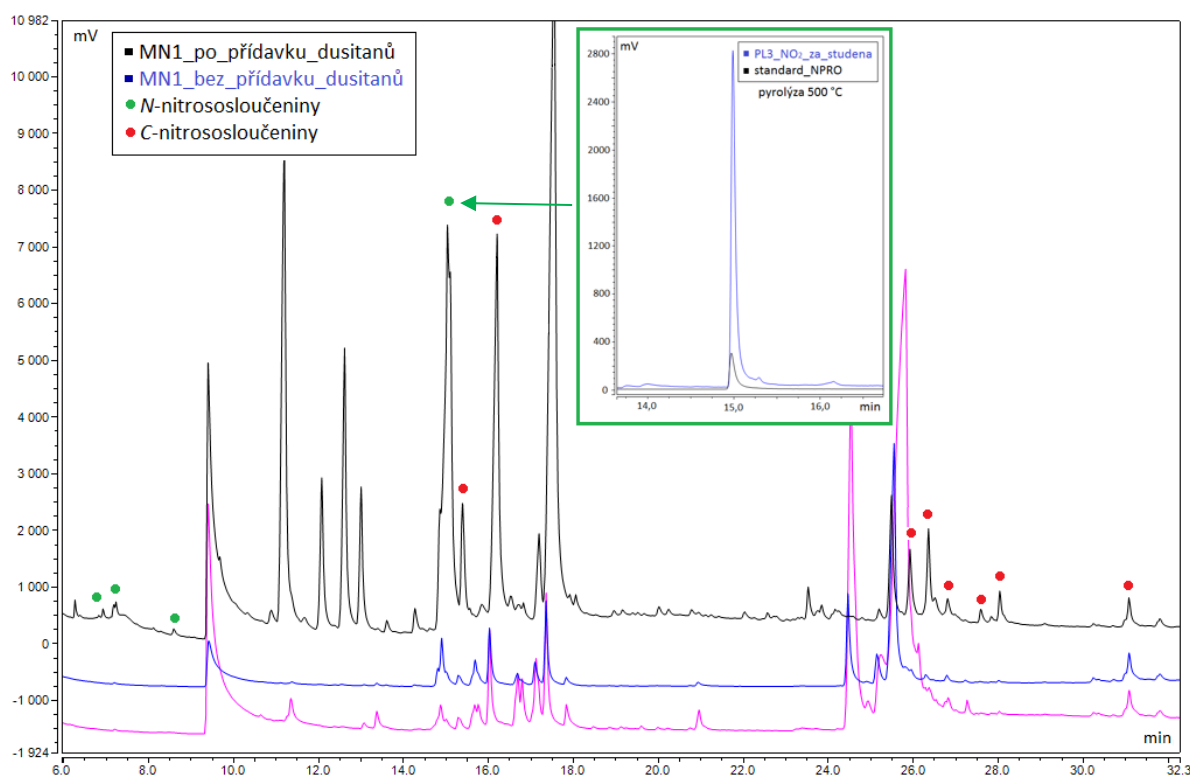
Obr. 3.2.2: Detail chromatogramu nitrosovaného sladu a těkavých *N*-nitrosaminů. Vzorky byly analyzovány na GC-NCD za totožných podmínek v kapitole 2.5, při pyrolyzní teplotě 750 °C.

3.2.2 Nitrosace sladu plynným oxidem dusičitým

V prvním experimentu byl slad zahříván v atmosféře oxidu dusičitého. Nitrosace probíhala přímo na namočených zrnech sladu a napodobovala fázi hvozdění, při které nitrososloučeniny vznikají nejvíce [25]. Příprava nitrosovaného sladu byla popsána v kapitole 2.8. Extrakty byly připraveny vyvinutou extrakční metodou, a proto bylo možné chromatogramy porovnat s nenitrosovanými slady. Nevýhodou tohoto způsobu přípravy byl nerovnoměrný ohřev sladu na topném hníždě. Nové látky mohly vznikat následovně: působením oxidu dusičitého na prekurzory ve sladu za vzniku nových nitrososloučenin, působením vysokých teplot mohou vznikat i jiné nenitrosované látky, které se v chromatogramu mohou objevit nebo kombinace obou zmíněných faktorů. Bylo proto v dalším kroku důležité připravit nitrosovaný slad tak, aby vysoké teploty nepřispívaly ke vzniku nových nenitrosovaných látek, jež nebyly předmětem této práce.

Postup přípravy sladu pro následující experiment je popsán v kapitole 2.8. Vzorky byly analyzovány na GC-NCD a byl zaznamenán pyrolyzní profil. Na **Obr. 3.2.3** je chromatogram sladu, který byl nitrosován stejným způsobem avšak bez ohřevu (černá linie); sladu, který byl připraven stejným způsobem, ale bez přidavku oxidu dusičitého (modrá linie) a surového sladu, který nebyl nijak ošetřen (růžová linie). Podle vyššího

počtu píků u nitrosovaného vzorku je patrný vznik nových látek. Vznik těchto látek již mohl být zapříčiněn pouze reakcí oxidu dusičitého s prekurzory ve sladu, bez ovlivnění vysokými teplotami. V detailu chromatogramu na **Obr. 3.2.3** je zobrazen výřez chromatogramu nitrosovaného sladu, analyzovaném při pyrolyzní teplotě 500 °C a vzorku standardu *N*-nitrosoprolinu (NPRO). Dle shody retenčních časů lze s vysokou mírou pravděpodobnosti předpokládat vznik *N*-nitrosoprolinu ve sladu, který byl upraven výše zmíněným způsobem.



Obr. 3.2.3: Srovnání nitrosovaného sladu za studena, se sladem nenitrosovaným ale stejně upraveným a se surovým sladem bez předchozí úpravy. Vzorky byly analyzovány na GC-NCD za totožných podmínek v kapitole 2.5, při pyrolyzní teplotě 750 °C (pro chromatogram v zeleně orámovaném detailu byla pyrolyzní teplota 500 °C).

3.3 Aplikace na reálné vzorky

Vyvinutá metoda byla na závěr aplikována na reálné vzorky sladů pocházejících z různých sladoven (viz **Tab. P1**). Pro každý slad byl zaznamenán pyrolyzní profil a chromatografické píky byly klasifikovány. Z provozních důvodů, měření probíhalo ve třech fázích po osmi vzorcích. Pro kontrolu opakovatelnosti metody byl v každé fázi měřen stejný slad plzeňského typu PL1. Bylo změřeno celkem devět plzeňských sladů,

tři mnichovské, tři karamelové, tři ječmeny, jeden pšeničný, jeden barvicí a dva nitrované slady připravené nitrosací plynným oxidem dusičitým za horka i za studena.

Celkové porovnání výsledků všech analýz pomocí teplotní mapy (z ang. Heat map) je zobrazeno na **Obr. 3.3.1**. Barevná škála mapy zobrazuje rozdělení klasifikovaných píků do skupin *N*-nitrososloučenin, *C*-nitrososloučenin, *C*-nitroso/nitrososloučenin a interferencí. Teplotní mapa vznikla kombinací dvou dendrogramů. Ve vertikálním směru byly reálné vzorky rozděleny do tří klastrů (ozn. **I**, **II**, **III**) podle podobnosti detekovaných a klasifikovaných píků. Druhý dendrogram rozdělil klasifikované píky do dvou hlavních klastrů, také podle typu jejich klasifikace.

Analyzované slady seřazené do jednotlivých klastrů jsou vyneseny v **Tab. 3.3.1**. U každého sladu je uvedena suma těkavých *N*-nitrosaminů, které byly v těchto sladech stanoveny v rámci rutinních analýz v laboratořích VÚPS. Slady klastru **I** obsahují vyšší koncentrace těkavých *N*-nitrosaminů, na rozdíl od sladů klastru **II** a **III**, kde byly těkavé *N*-nitrosaminy pod limitem stanovitelnosti. Dle teplotní mapy je pro slady klastru **I** charakteristické velké množství píků *C*-nitrososloučenin v daných retenčních časech. Množství *C*-nitrososloučenin v jednotlivých klastrech koresponduje s koncentrací těkavých *N*-nitrosaminů. Výjimkou v klastru **I** tvoří pšeničný slad, který má sumu těkavých *N*-nitrosaminů pod limitem stanovitelnosti. Příčinou stejně vysokého množství těkavých *C*-nitrososloučenin mohlo být, že slad pochází z jiné matrice.

Tab. 3.3.1: Slady klastru **I**, **II** a **III** s hodnotami těkavých *N*-nitrososloučenin

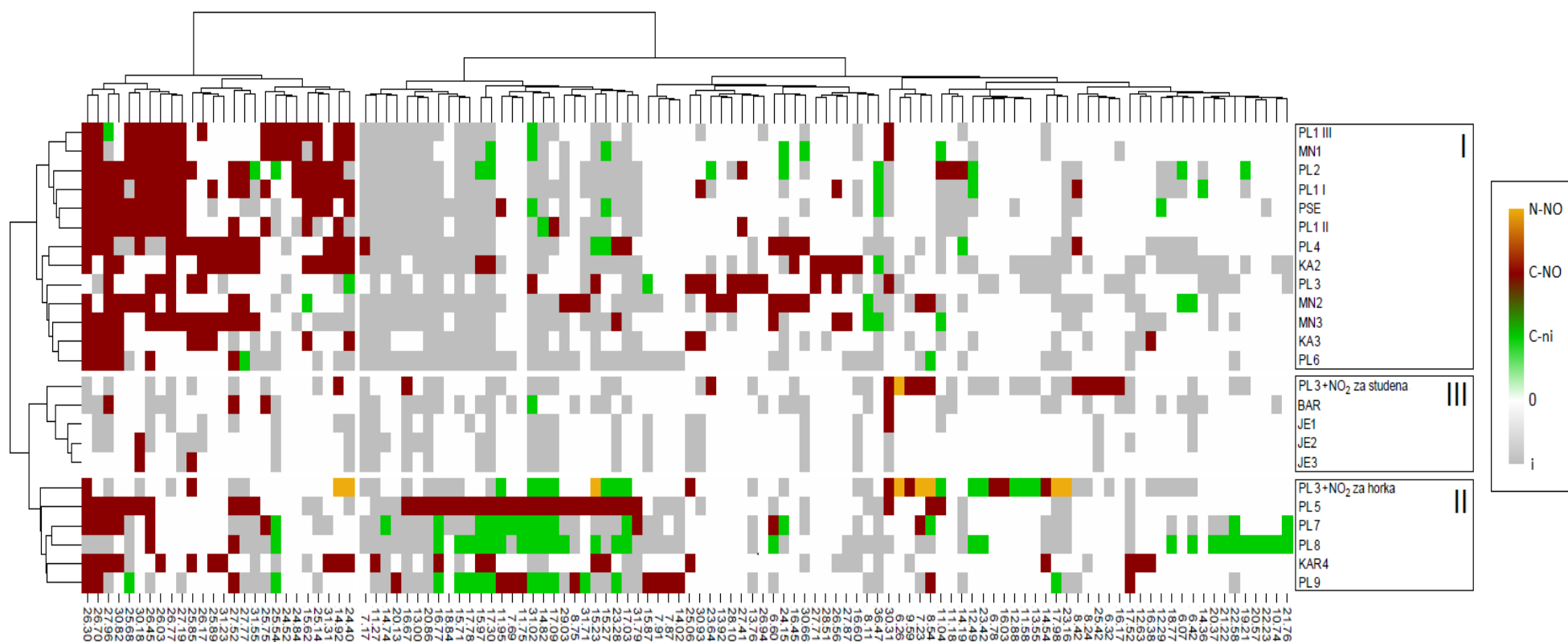
	Slad	Suma		Slad	Suma
		(NDMA,NPYR, NPIP) [µg/kg]			(NDMA,NPYR, NPIP) [µg/kg]
Klastr I	MN2	10,9	Klastr II	PL 5	1,0
	PL4	8,4		PL7	0,6
	MN3	4,0		PL8	<0,2
	PL2	2,2		KA4	2,1
	MN1	1,8		PL9	0,8
	PL1	1,6		PL3 + NO ₂ za horka	-
	KA2	1,5	Klastr III	BAR	<0,2
	PL6	1,5		JE1	-
	PL3	0,6		JE2	-
	KA3	0,6		JE3	-
	PSE	<0,2		PL3 + NO ₂ za studena	-

*Sumy koncentrací NDMA, NPYR, NPIP byly získány z databáze VÚPS

Pro slady klastru **II** jsou charakteristické naopak shluky píků, klasifikované jako *C*-nitroso/nitrosloučeniny příp. *C*-nitrososloučeniny. Klast **III** obsahuje obecně ječmeny a slady s nízkým zastoupením *C*-nitrososloučenin. Další výjimky tvoří nitrované slady, které spadají zvlášť do rozdílných klastrů. Důvodem může být skutečnost, že v těchto sladech bylo nalezeno menší množství *C*-nitrososloučenin než ve zbylých vzorcích. Naopak jako jediné, tyto vzorky obsahovaly *N*-nitrososloučeniny, ale s rozdílnými retenčními časy. Jelikož byly nitrované slady připravovány za rozdílných podmínek, vznikaly v nich proto látky různého původu.

Lze si všimnout rozdílné klasifikace pro píky eluující ve stejném retenčním čase. Užívaná klasifikační funkce činila po validaci přesnost 96,12 % a dá se tedy považovat za spolehlivou metodu [11]. Nicméně v chromatogramech takto komplexních vzorků sladů se ve stejném retenčním čase nachází koeluující píky dvou různých látek, které způsobují různorodou klasifikaci.

Aplikací extrakční metody s klasifikační funkcí na reálné vzorky byly vytipovány retenční časy píků hledaných nitrososloučenin s neznámou strukturou. Díky této screeningové metodě lze píky klasifikované jako *N*-nitrososloučeniny, *C*-nitrososloučeniny a *C*-nitroso/nitrosloučeniny rozlišit od píků interferencí. Metoda tak tvoří základ pro další výzkum, který se bude zabývat zjištěním jejich strukturních vlastností.



Obr.3.3.1: Teplotní mapa analyzovaných reálných vzorků podle typu jejich klasifikace v daném retenčním čase, kde **N-NO** představuje píky klasifikované jako *N*-nitrososloučeniny, **C-NO** značí *C*-nitrososloučeniny, **C-ni** značí *C*-nitroso/nitrososloučeniny, **0** znamená, že v daném retenčním čase nebyla látka detekovaná a **i** značí píky interferenci.

Závěr

Cílem práce bylo vyvinout rychlý extrakční postup pro screening netěkavých nitrososloučenin ve sladu pomocí plynové chromatografie s chemiluminiscenční detekcí. Jelikož jsou hledané analyty netěkavé, pro zvýšení jejich těkavosti bylo nutné dané analyty derivatizovat. Aby derivatizace hledaných analytů probíhala kvantitativně, mohla být jako extrakční činidla použita pouze aprotická rozpouštědla. Postup přípravy vzorků měl být jednoduchý a časově nenáročný. Pro přípravu vzorků mělo být použito co nejmenší množství organických rozpouštědel, čehož bylo dosaženo, protože pro úspěšnou extrakci bylo potřeba pouze 200 μ l směsi extrakčního a derivatizačního činidla.

Během vývoje extrakční metody byly optimalizovány následující dílčí postupy: vzorky extrahovaných nitrososloučenin lze připravit extrakcí z namletých celých zrn sladu a není nutná separace sladových pluch od zbytku zrna. Směs rozpouštědel pyridinu a acetonitrilu v poměru 60:40 (v/v) měla nejlepší extrakční účinnost pro hledané analyty. Ultrazvuková lázeň na množství analytů v extraktu působí negativně, jelikož hledané analyty pravděpodobně rozkládá. Dvoukrokový derivatizační postup zahrnující silylační činidla HMDS a BSTFA je vhodný pro silylaci derivátů sacharidů a dalších hledaných analytů o neznámé struktuře. Tento derivatizační postup nezpůsobuje štěpení hledaných analytů a umožňuje tak analýzu těchto látek na plynové chromatografii. Poměr jednotlivých činidel extrakční směsi: HMDS: BSTFA činil 50:100:50 (v/v/v). Po celkové optimalizaci metody byl čas extrakce a ustalování zkrácen na 10 min (při 65 °C a 20 °C). Čas první a druhé derivatizace byl ponechán po dobu 30 min při 65 °C.

Extrakční metoda byla následně spojena s klasifikační metodou. Klasifikační metoda rozdělila chromatografické píky do skupin *N*-nitrososloučenin, *C*-nitrososloučenin a *C*-nitroso/nitrososloučenin a oddělila je tím od píků klasifikovaných jako interference. Spojením těchto dvou metod, extrakční a klasifikační, byla získána požadovaná screeningová metoda, na základě které lze stavět další výzkum, zabývající se strukturou a vlastnostmi netěkavých nitrososloučenin.

Bibliografie

- [1] H. Bartsch and R. Montesano, "Relevance of nitrosamines to human cancer", *Carcinogenesis*, vol. 5, no. 11, pp. 1381-1393, 1984.
- [2] B. Spiegelhalder, G. Eisenbrand and R. Preussmann, "Contamination of beer with trace quantities of *N*-nitrosodimethylamine", *Food and Cosmetics Toxicology*, vol. 17, no. 1, pp. 29-31, 1979.
- [3] T. Wainright, "The chemistry of nitrosamine formation: Relevance to malting and brewing", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 92, no. 1, pp. 49-64, 1986.
- [4] T. Wainwright, "Nitrosamines in malt and beer", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 92, no. 1, pp. 73-80, 1986.
- [5] T. Vrzal and J. Olšovská, "*N*-nitrosaminy v 21. století", *Kvasný Průmysl*, vol. 62, no. 1, pp. 2-8, 2016.
- [6] D. Williams, *Nitrosation*, Illustrated ed. New York: Cambridge University Press, 1988.
- [7] C. Walters, R. Hart and P. Smith, "Determination of total *N*-nitroso compounds as a group by denitrosation to nitric oxide, with detection using a chemiluminescence analyzer", *IARC Scientific Publications*, vol. 45, no. 6, pp. 295-308, 1983.
- [8] J. Čulík, T. Horák, P. Čejka and M. Jurková, "Netěkavé *N*-nitrosaminy v pivovarství, Část I. – Vznik a metody stanovení", *Kvasný průmysl*, vol. 58, no. 1, pp. 6-12, 2012.
- [9] J. Čulík, T. Horák, P. Čejka and M. Jurková, "Netěkavé *N*-nitrosaminy v pivovarství Část II. – Studium účinků UV záření na ATNC a vybrané zástupce *N*-nitrosoamino kyselin v pivu", *Kvasný Průmysl*, vol. 58, no. 2, pp. 26-29, 2012.
- [10] P. Johnson, J. Pfab, A. Tricker, P. Key and R. Massey, "An investigation into the apparent total *N*-nitroso compounds in malts", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 93, no. 4, pp. 319-321, 1987.
- [11] T. Vrzal, D. Matoulková and J. Olšovská, "A New Method for Detection and Classification of Non-Volatile Nitroso Compounds in Beer Combining Gas Chromatography with Chemiluminescence Detection and Discriminant Analysis", *Modern Analytical Chemistry*, vol. 13, no. 1, pp. 12-19, 2017.
- [12] G. Basařová, *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*, Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010.
- [13] S. Heisel, ed., in *Brewing: new technologies*, 10 ed., Cambridge: Woodhead Publishing limited, 2006, p. 42.
- [14] G. Basařová, *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*, Vyd. 1. Praha: Havlíček Brain Team, 2015.
- [15] E. Inns, L. Buggey, H. Nursten and J. Ames, "Effect of a simulated kilning regime on the profile and antioxidant activity of the free phenolic acids extracted from green malt", *Technical Quarterly & the MBAA Communicator*, vol. 42, no. 3, pp. 204-208, 2005.
- [16] G. Harris and R. Ricketts, "Flavonoid compounds of hops and of malt concerned in the formation of beer hazes", *Chemistry & Industry (London, United Kingdom)*, pp. 686-687, 1958.

- [17] R. Kepner, J. Strating and C. Weurman, "Quantitative determination of esters in beer by gas chromatographic analysis of head space vapours", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 69, no. 5, pp. 399-405, 1963.
- [18] F. White and T. Wainwright, "The presence of two dimethyl sulphide precursors in malt, their control by malt kilning conditions, and their effect on beer DMS levels", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 83, no. 4, pp. 224-230, 1977.
- [19] F. Malíř and V. Ostrý, *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*, Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003.
- [20] C. Wolf-Hall, "Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 119, no. 1-2, pp. 89-94, 2007.
- [21] R. Mikulíková and K. Sobotová, "Determination of Acrylamide in Malt with GC-MS", *Acta Chimica Slovenica*, vol. 54, no. -, pp. 98-101, 2007.
- [22] S. Coghe, S. Stefanie, B. Adriaenssens and F. Delvaux, "Fractionation of Colored Maillard Reaction Products from Dark Specialty Malts", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 62, no. 2, pp. 79-86, 2004.
- [23] P. Čejka, J. Dvořák and J. Čulík, "Chování toxických kovů v pivovarském procesu", *Kvasný Průmysl*, vol. 55, no. 4, pp. 100-108, 2009.
- [24] S. Cohen and G. Zweig, "Analytical Determination of *N*-nitroso compounds in pesticides: A preliminary study", *Environmental Protection Agency*, pp. 333-342, 1978.
- [25] J. Čulík, V. Kellner and B. Špinar, "Těkavé *N*-nitrosaminy ve sladu: I. Vliv pesticidů a dusíkatých hnojiv aplikovaných ve vegetačním období na obsah těkavých *N*-nitrosaminů v ječmeni a sladu", *Kvasný Průmysl*, vol. 35, no. 10, pp. 289-292, 1989.
- [26] J. Čulík, V. Kellner and B. Špinar, "Těkavé *N*-nitrosaminy ve sladu: II. Vliv základních technologických podmínek hvozdění na obsah *N*-nitrosodimethylaminu ve sladu", *Kvasný Průmysl*, vol. 35, no. 12, pp. 353-356, 1989.
- [27] J. Čulík, V. Kellner and B. Špinar, "Těkavé *N*-nitrosaminy ve sladu: III. Vliv technologie klíčení ječmene na vznik přirozených prekurzorů *N*-nitrosodimethylaminu v zeleném sladu a obsah *N*-nitrosodimethylaminu v hotovém sladu", *Kvasný Průmysl*, vol. 36, no. 6, pp. 162-165, 1990.
- [28] D. Kocak, M. Ozel, F. Gogus, J. Hamilton and A. Lewis, "Determination of volatile nitrosamines in grilled lamb and vegetables using comprehensive gas chromatography – Nitrogen chemiluminescence detection", *Food Chemistry*, vol. 135, no. 4, pp. 2215-2220, 2012.
- [29] S. Herrmann, L. Duedahl-Olesen and K. Granby, "Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation", *Journal of Chromatography A*, vol. 1330, pp. 20-29, 2014.
- [30] Q. Ma, H. Xi, C. Wang, H. Bai, G. Xi, N. Su, L. Xu and J. Wang, "Determination of Ten Volatile Nitrosamines in Cosmetics by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry", *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 39, no. 8, pp. 1201-1207, 2011.

- [31] Y. Zhao, J. Boyd, S. Hrudey and X. Li, "Characterization of New Nitrosamines in Drinking Water Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry", vol. 40, no. 24, pp. 7636-7641, 2006.
- [32] C. Ripollés, E. Pitarch, J. Sancho, F. López and F. Hernández, "Determination of eight nitrosamines in water at the ngL⁻¹ levels by liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, vol. 702, no. 1, pp. 62-71, 2011.
- [33] B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros and M. Gallego, "Gas Chromatographic Determination of N -Nitrosamines in Beverages Following Automatic Solid-Phase Extraction", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 24, pp. 9758-9763, 2007.
- [34] F. Francis, *Encyclopedia of food science and technology*, 2nd ed. New York: Wiley, 2000.
- [35] Y. Motarjemi, G. Moy and E. Todd, *Encyclopedia of food safety*, First edition. Boston: Elsevier, Academic Press, 2014.
- [36] J. Davídek, *Natural toxic compounds of foods: formation and change during processing and storage*. Boca Raton: CRC Press, 1995.
- [37] M. Goicolea, Z. Balugera, M. Portela and R. Barrio, "Determination of N-nitrosopiperidine in beers by liquid chromatography with reductive amperometric detection at a hanging mercury drop electrode", *Analytica Chimica Acta*, vol. 305, no. -, pp. 310-317, 1995.
- [38] A. Ngongang, S. Duy and S. Sauvé, "Analysis of nine N-nitrosamines using liquid chromatography-accurate mass high resolution-mass spectrometry on a Q-Exactive instrument", *Analytical Methods*, vol. 7, no. 14, pp. 5748-5759, 2015.
- [39] M. Al-Kaseem, Z. Al-Assaf and F. Karabeet, "Determination of Seven Volatile N-Nitrosamines in Fast Food", *Pharmacology*, vol. 05, no. 02, pp. 195-203, 2014.
- [40] A. Helguera, M. Cordeiro, M. Pérez, R. Combes and M. González, "Quantitative structure carcinogenicity relationship for detecting structural alerts in nitroso compounds☆Species: Rat; Sex", *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 231, no. 2, pp. 197-207, 2008.
- [41] H. Kushida, K. Fujita and A. Suzuki, "Metabolic activation of N-alkylnitrosamines in genetically engineered Salmonella typhimurium expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase", *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 6, pp. 1227-1232, 2000.
- [42] K. Rostkowska, K. Zwierz and A. Rózański, "Formation and Metabolism of N-Nitrosamines", *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 7, no. 6, pp. 321-325, 1998.
- [43] J. Pollock, "Aspects of nitrosation in malts and beers. I.Examination of malts for the presence of N-nitrosoproline, N-nitrososarcosine and N-nitrosopipecolinic acid", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 87, no. 6, pp. 356-359, 1981.
- [44] K. Inami, J. Shiino, S. Hagiwara, K. Takeda and M. Mochizuki, "Transnitrosation of non-mutagenic N-nitrosoproline forms mutagenic N-nitroso-N-methylurea", vol. 23, no. 13, pp. 3297-3302, 2015.
- [45] K. Eichner, M. Reutter and R. Wittmann, "Detection of Amadori Compounds in Heated Foods", *Thermally Generated Flavors*, pp. 42-54, 1993.

- [46] M. Namiki, "Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens.", *Advances in Food Research*, vol. 32, no. -, pp. 164-165, 1988.
- [47] B. Pignatelli, R. Scriban, G. Descotes and H. Bartsch, "Modifying Effects of Polyphenols and Other Constituents of Beer on the Formation of *N*-Nitroso Compounds", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 42, no. 1, pp. 18-23, 1984.
- [48] M. Ahmad, L. Libbey, J. Barbour and R. Scanlan, "Isolation and characterization of products from the nitrosation of the alkaloid gramine", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 23, no. 9, pp. 841-847, 1985.
- [49] L. Lucas, D. Gatehouse and D. Shuker, "Efficient nitroso group transfer from *N*-nitrosoindoles to nucleotides and 2'-deoxyguanosine at physiological pH. A new pathway for *N*-nitrosocompounds to exert genotoxicity", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 26, pp. 18319-18326, 1999.
- [50] J. Olšovská, D. Matoulková, P. Čejka and M. Jurková, "Beer and Health", *Kvasný Průmysl*, vol. 60, no. 7, pp. 174-181, 2014.
- [51] S. Hirota and U. Takahama, "Reactions of polyphenols in masticated apple fruit with nitrite under stomach simulating conditions: Formation of nitroso compounds and thiocyanate conjugates", *Food Research International*, vol. 75, pp. 20-26, 2015.
- [52] W. Kuenzig, J. Chau, E. Norkus, H. Holowaschenko, H. Newmark, W. Mergens and A. Conney, "Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation", *Carcinogenesis*, vol. 5, no. 3, pp. 309-313, 1984.
- [53] H. Stich, M. Rosin and L. Bryson, "Inhibition of mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffee and tea", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 95, no. 2-3, pp. 119-128, 1982.
- [54] D. McWeeny, "Nitrosamines in beverages", *Food Chemistry*, vol. 11, no. 4, pp. 273-287, 1983.
- [55] E. Walker, B. Pignatelli and M. Friesen, "The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 33, no. 1, pp. 81-88, 1982.
- [56] M. González-Jiménez, J. Arenas-Valgañón, M. García-Santos, E. Calle and J. Casado, "Mutagenic products are promoted in the nitrosation of tyramine", *Food Chemistry*, vol. 216, no. -, pp. 60-65, 2017.
- [57] A. Butler, R. Field and I. Greig, "An Examination of Some Derivatives of *S*-Nitroso-1-thiosugars as Vasodilators", *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, vol. 1, no. 3, pp. 211-217, 1997.
- [58] V. Kellner, J. Čulík and G. Basařová, "*N*-nitrosaminy ve sladu - vznik a odstraňování", *Kvasný Průmysl*, vol. 29, no. -, pp. 28-31, 1983.
- [59] M. Mangino and R. Scanlan, "Nitrosation of the alkaloids hordenine and gramine, potential precursors of *N*-nitrosodimethylamine in barley malt", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 33, no. 4, pp. 699-705, 1985.
- [60] C. Janzowski, R. Klein, R. Preussmann and G. Eisenbrand, "Nitrosation of sarcosine, proline and 4-hydroxyproline by exposure to nitrogen oxides", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 20, no. 5, pp. 595-597, 1982.

- [61] G. Drabik-Markiewicz, B. Dejaegher, E. De Mey, T. Kowalska, H. Paelinck and Y. Vander Heyden, "Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of *N*-nitrosamine in heated cured pork meat", *Food Chemistry*, vol. 126, no. 4, pp. 1539-1545, 2011.
- [62] H. Pourazrang, A. Moazzami and B. Bazzaz, "Inhibition of mutagenic *N*-nitroso compound formation in sausage samples by using l-ascorbic acid and α -tocopherol", *Meat Science*, vol. 62, no. -, pp. 479-483, 2002.
- [63] T. Rundlof, E. Olsson and A. Wiernik, "Potential Nitrite Scavengers as Inhibitors of the Formation of *N*-Nitrosamines in Solution and Tobacco Matrix Systems", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. -, pp. 4381-4388, 2000.
- [64] N. Smith, P. Smith and C. Woodruff, "The role of *Bacillus* spp. in *N*-nitrosamine formation during wort production", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 98, no. 5, pp. 409-414, 1992.
- [65] R. Massey, P. Key and D. McWeeny, "An investigation of apparent total *N*-nitroso compounds in beer", *IARC Publications*, vol. 84, no. -, pp. 219-221, 1987.
- [66] J. Haorah, L. Zhou, X. Wang, G. Xu and S. Mirvish, "Determination of Total *N*-Nitroso Compounds and Their Precursors in Frankfurters, Fresh Meat, Dried Salted Fish, Sauces, Tobacco, and Tobacco Smoke Particulates", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 12, pp. 6068-6078, 2001.
- [67] L. Cárdenes, J. Ayala, V. González and A. Afonso, "Fast microwave-assisted dansylation of *N*-nitrosamines Analysis by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *Journal of Chromatography A*, vol. 946, no. -, pp. 133-140, 2002.
- [68] K. Ikeda and K. Migliorese, "Analysis of nitrosamines in cosmetics", *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, vol. 41, no. -, pp. 283-333, 1990.
- [69] J. Boyd, S. Hrudey, X. Li and S. Richardson, "Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography mass spectrometry analysis of nitrosamines in treated drinking water and wastewater", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, no. 9, pp. 1410-1421, 2011.
- [70] M. Krauss and J. Hollender, "Analysis of Nitrosamines in Wastewater: Exploring the Trace Level Quantification Capabilities of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer", *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 3, pp. 834-842, 2008.
- [71] F. Lona-Ramirez, G. Gonzalez-Alatorre, V. Rico-Ramírez, M. Perez-Perez and E. Castrejón-González, "Gas chromatography/mass spectrometry for the determination of nitrosamines in red wine", *Food Chemistry*, vol. 196, pp. 1131-1136, 2016.
- [72] N. Sen, S. Seaman and M. McPherson, "Nitrosamines in alcoholic beverages", *Journal of Food Safety*, vol. 2, no. 1, pp. 13-18, 1980.
- [73] N. Sen, L. Tessier and S. Seaman, "Determination of *N*-nitrosoproline and *N*-nitrososarcosine in malt and beer", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 31, no. 5, pp. 1033-1036, 1983.
- [74] P. Johnson, J. Pfab and R. Massey, "Development of methods for the characterisation of non-volatile *N*-nitroso compounds in malt", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 94, no. 1, pp. 19-22, 1988.

- [75] R. Pozzi, P. Bocchini, F. Pinelli and G. Galletti, "Determination of nitrosamines in water by gas chromatography/chemical ionization/selective ion trapping mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 14, pp. 1808-1814, 2011.
- [76] E. De Mey, K. De Klerck, H. De Maere, L. Dewulf, G. Derdelinckx, M. Peeters, I. Fraeye, Y. Vander Heyden and H. Paelinck, "The occurrence of *N*-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation", *Meat Science*, vol. 96, no. 2, pp. 821-828, 2014.
- [77] P. Sanches Filho, A. Rios, M. Valcárcel, M. Soares Melecchi and E. Bastos Caramão, "Method of Determination of Nitrosamines in Sausages by CO₂ Supercritical Fluid Extraction (SFE) and Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 3, pp. 603-607, 2007.
- [78] B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros and M. Gallego, "Comparison of microwave assisted, ultrasonic assisted and Soxhlet extractions of *N*-nitrosamines and aromatic amines in sewage sludge, soils and sediments", *Science of The Total Environment*, vol. 463-464, pp. 293-301, 2013.
- [79] M. Huang, H. Chen, S. Fu and W. Ding, "Determination of volatile *N*-nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction coupled with dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography – Chemical ionisation mass spectrometry", *Food Chemistry*, vol. 138, no. 1, pp. 227-233, 2013.
- [80] S. Ventanas and J. Ruiz, "On-site analysis of volatile nitrosamines in food model systems by solid-phase microextraction coupled to a direct extraction device", *Talanta*, vol. 70, no. 5, pp. 1017-1023, 2006.
- [81] D. Vavrová, "Stanovení netěkavých *N*-nitrosaminů ve sladu", Diplomová práce, Praha, 2016.
- [82] M. Byun, H. Ahn and . Kim, "Determination of volatile *N*-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer", *Journal of Chromatography A*, vol. 1054, no. 1-2, pp. 403-407, 2004.
- [83] A. Sannino and L. Bolzoni, "GC/CI-MS/MS method for the identification and quantification of volatile *N*-nitrosamines in meat products", *Food Chemistry*, vol. 141, no. 4, pp. 3925-3930, 2013.
- [84] J. Little, "Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them", *Journal of Chromatography A*, vol. 844, no. -, pp. 1-22, 1999.
- [85] R. Massey, C. Crews and D. McWeeny, "Method for high-performance liquid chromatographic measurement of *N*-nitrosamines in food and beverages", *Journal of Chromatography*, vol. 241, no. -, pp. 423-427, 1982.
- [86] P. Kulshrestha, K. McKinstry, B. Fernandez and M. Feelisch, "Application of an Optimized Total *N*-Nitrosamine (TONO) Assay to Pools: Placing *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) Determinations into Perspective", *Environmental Science & Technology*, vol. 44, no. -, pp. 3369-3375, 2010.
- [87] J. Wang, W. Chan, S. Haut, M. Krauss and R. Izac, "Determination of Total *N*-Nitroso Compounds by Chemical Denitrosation Using CuCl", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 12, 2005.

- [88] D. Fine, D. Rounbehler and N. Sen, "A comparison of some chromatographic detectors for the analysis of volatile *N*-nitrosamines", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 24, no. 5, pp. 980-984, 1976.
- [89] D. Fine, F. Ruff, D. Lieb and D. Rounbehler, "Description of the thermal energy analyzer (TEA) for trace determination of volatile and nonvolatile *N*-nitroso compounds", *Analytical Chemistry*, vol. 47, no. 7, pp. 1188-1191, 1975.
- [90] L. Snyder, "Classification of the Solvent Properties of Common Liquids", *Journal of chromatographic science*, vol. 16, no. -, pp. 223-234, 1978.
- [91] R. Leardi, "Experimental design in chemistry: A tutorial", *Analytica Chimica Acta*, vol. 652, no. 1-2, pp. 161-172, 2009.
- [92] L. Vera Candioti, M. De Zan, M. Cámara and H. Goicoechea, "Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development.", *Talanta*, vol. 124, no. -, pp. 123-138, 2014.
- [93] J. Kubincová, J. Višňovský and M. Rosenberg, "Application of high-temperature GC-MS for simultaneous identification and quantification of glycosidic forms of iridoids and flavonoids in plant samples", *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 55, no. -, pp. 374-381, 2016.
- [94] L. Gabrišová, P. Kotora and P. Peciar, "Characterization of Nutritional Supplement With Content of *Vaccinium macrocarpon* Based on Comparison of Chosen Flavonol Glycosides by HTGC-MS 126", *Proceedings of the 13th ISC Modern Analytical Chemistry*, vol. -, no. -, pp. 126-130, 2017.
- [95] A. Ruiz-Matute, O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez and M. Sanz, *Journal of Chromatography B*, vol. 879, no. 17-18, 2011.

Přílohy

Tab. P1: Seznam použitých sladů*

Ozn.	Typ sladu	NDMA [ug/kg]	NPYR [ug/kg]	NPIP [ug/kg]	Původ sladů
PL1	plzeňský	1,6	-	-	Sladovna Prostějov
PL2	plzeňský	2,2	-	-	Sladovna Prostějov
PL3	plzeňský	-	-	-	Sladovna Prostějov
PL4	plzeňský	8,4	-	-	Družina spol. s r.o. Dačice
PL5	plzeňský	0,6	-	0,4	Sladovna Nymburk
PL6	plzeňský	1,5	-	-	Slodownia Soufflet, Polsko
PL7	plzeňský	0,6	-	-	Sladovna Nymburk
PL8	plzeňský	<0,2	-	-	Sladovna Nymburk
PL9	plzeňský	0,8	-	-	Pivovar FERDINAND s.r.o.
MN1	mnichovský	1,8	-	-	Sladovna Prostějov
MN2	mnichovský	10,2	0,7	-	Sladovna Prostějov
MN3	mnichovský	4,0	-	-	Družina spol. s r.o. Dačice
KA1	karamelový	-	-	-	Družina spol. s r.o. Dačice
KA2	karamelový	0,9	0,6	-	Družina spol. s r.o. Dačice
KA3	karamelový	<0,2	0,4	-	Sladovna Litovel
KA4	karamelový	0,9	1,2	-	Sladovna Litovel
PSE	pšeničný	<0,2	-	-	Sladovna Prostějov
BAR	barvicí	<0,2	-	-	Sladovna Litovel
JE1	Ječmen	-	-	-	VÚPS Brno
JE2	Ječmen	-	-	-	VÚPS Brno
JE3	Ječmen	-	-	-	VÚPS Brno
JE4	Ječmen	-	-	-	VÚPS Brno
SL1	plzeňský	-	-	-	VÚPS Brno
SL2	plzeňský	-	-	-	VÚPS Brno
SL3	plzeňský	-	-	-	VÚPS Brno
SL4	plzeňský	-	-	-	VÚPS Brno

* Koncentrace NDMA, NPYR a NPIP byly získány z databáze VÚPS

Tab. P2: Návrh směsového designu pro tři rozpouštědla

Standardní postup	Postup přípravy	Objemový poměr		
		pyridin	acetonitril	ethyacetát
2	1	0,0	1,0	0,0
5	2	0,5	0,0	0,5
10	3	0,2	0,2	0,7
4	4	0,5	0,5	0
1	5	1,0	0,0	0,0
7	6	0,3	0,3	0,3
3	7	0,0	0,0	1,0
8	8	0,7	0,2	0,2
9	9	0,2	0,7	0,2
6	10	0,0	0,5	0,5

Tab. P3: Návrh směsového designu pro pět rozpouštědel

Standardní postup	Postup přípravy	Objemový poměr				
		aceton	acetonitril	chloroform	pyridin	ethyacetát
4	1	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
3	2	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
10	3	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1
11	4	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1
2	5	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
6	7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
1	8	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
7	9	0,1	0,1	0,1	0,1	0,6
8	10	0,6	0,1	0,1	0,1	0,1
9	11	0,1	0,6	0,1	0,1	0,1
5	12	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0

Tab. P4: Návrh Plackettova-Burmanova designu pro celkovou optimalizaci

Standardní postup	Postup přípravy	Faktory			
		A [min]	B [min]	C [min]	D [min]
12	1	10	10	10	10
6	2	30	30	30	10
11	3	10	30	10	10
9	4	10	10	10	30
10	5	30	10	10	10
5	6	30	30	10	30
1	7	30	10	30	10
3	8	10	30	30	10
7	9	10	30	30	30
2	10	30	30	10	30
8	11	10	10	30	30
4	12	30	10	30	30

A - čas extrakce, **B** - čas první derivatizace HMDS, **C** - čas druhé derivatizace BTFA a **D** - čas ustálení